

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 20 November 2000 (20.11.00) | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | Applicant's or agent's file reference 2597WO0P |
| International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) |
| Applicant NANBA, Masayoshi et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

14 September 2000 (14.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 21 November 2000 (21.11.00) | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | Applicant's or agent's file reference 2597WO0P |
| International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) |
| Applicant NANBA, Masayoshi et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

14 September 2000 (14.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

THIS PAGE BLANK (USPTO)



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) 国際特許分類7 C12N 5/10, C12Q 1/02, A61K 45/00, A61P 1/16 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/65031 (43) 国際公開日 2000年11月2日(02.11.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP00/02763 (22) 国際出願日 2000年4月27日(27.04.00) (30) 優先権データ 特願平11/120747 1999年4月27日(27.04.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 難波正義(NANBA, Masayoshi)[JP/JP] 〒700-0001 岡山県岡山市宿400-1 Okayama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 朝日 知(ASAHI, Satoru)[JP/JP] 〒565-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番A-307 Osaka, (JP) 吉富純枝(YOSHITOMI, Sumie)[JP/JP] 〒535-0001 大阪府大阪市旭区太子橋1丁目27番4号 Osaka, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP) (81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーロシヤ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54)Title: HUMAN CELL LINE SHOWING STABLE EXPRESSION OF CYTOCHROMES P450 (54)発明の名称 チトクロームP450を安定に発現するヒト細胞株 (57) Abstract A cell line obtained from a human liver-origin incubated cell line as a host and showing stable expression of a number of human cytochromes P450, etc. Because of showing stable expression of human cytochromes P450 CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 and 3A4, the human liver-origin incubated cell line is useful in, for example, analyzing an enzyme participating in the metabolism of a foreign matter <i>in vivo</i> or an endogenous substrate. | | |

(57)要約

本発明はヒト肝臓由来の培養細胞株を宿主とし、多数のヒト型チトクロームP450を安定に発現している細胞株などに関する。

本発明のヒト肝臓に由来する培養細胞株は、ヒト型チトクロームP450 CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 を安定に発現するため、生体異物およびまたは内在性基質代謝に関与する酵素の解析などに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-------------------|-----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AG | アンティグア・バーブーダ | DZ | アルジェリア | LC | セントルシア | SDE | スーダン |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | GW | ギニア・ビサウ | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | MN | モンゴル | TZ | タンザニア |
| CF | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | UA | ウクライナ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MW | マラウイ | UG | ウガンダ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MX | メキシコ | US | 米国 |
| CI | コートジボワール | IL | イスラエル | MZ | モザンビーク | UZ | ウズベキスタン |
| CM | カメルーン | IN | インド | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | IS | アイスランド | NL | オランダ | YU | ユーゴスラヴィア |
| CR | コスタ・リカ | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CU | キューバ | JP | 日本 | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CY | キプロス | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CZ | チェッコ | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | | |
| DE | ドイツ | KP | 北朝鮮 | | | | |
| DK | デンマーク | KR | 韓国 | | | | |

明 細 書

チトクロームP450を安定に発現するヒト細胞株

技術分野

5 本発明は、

1. ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌細胞由来の細胞株、
2. 該細胞株を用いることを特徴とする(1) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の解析方法、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造
- 10 の解析方法、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析方法、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析方法、(9) 薬物代
- 15 謝による発ガン性発現の解析方法、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析方法、(12) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法、
3. 該細胞株を用いることを特徴とする(1) 生体異物および／または内在性基
- 20 質代謝酵素を阻害する物質の探索方法、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索方法、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索方法、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索方法、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索方法、
- 25 (6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索方法、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする

物質の探索方法、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索方法、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法

- 5 4. 該探索方法を用いて得られる化合物又はその塩等に関する。

背景技術

- 肝臓細胞は非常に多くの生理的機能を有しているが、なかでも薬物、食品添加物、環境汚染物質および化学工業製品などの生体異物および／または内在性
- 10 基質の代謝に関して非常に重要な機能を果たしている。この生体異物および／または内在性基質の代謝の機能は同時に生体異物および／または内在性基質による生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝
- 15 毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現、生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性発現などをもたらす場合があり、非常に広く研究が進められている。ここでいう生体異物および／または内在性基質の代謝には多くの酵素が関与していることが知られている。この中にはUDP-
- 20 グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラーターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびチトクロームP450などが含まれる。またチトクロームP450が、その酵素機能を発現するためにはチトクロームP450還元酵素の存在が必須である。これら酵素群の中で、生体異物および／または
- 25 内在性基質の代謝に関してはチトクロームP450が最も重要な役割を果たしている。チトクロームP450は、非常に多くの分子種を含む酵素群の総称であり、ヒ

トの肝臓における生体異物および／または内在性基質の代謝においては、CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4の10種が特に重要だとされている。また、これらヒト肝臓に分布している酵素は個体差が大きいため、ヒトに由来する肝臓試料は、安定な試験系として5 しては使用できない。一方、かかる肝臓の代謝機能には生物種により非常に強い特異性すなわち種差が存在し、ヒトにおける種々の代謝機能をラットなどの実験動物において予測することは困難である。しかしながらこれらの検討項目を実際のヒトで解析することは多くの場合不可能である。このような理由からヒト培養肝細胞は、実験動物の代替法として迅速かつ安価かつ安全かつ正確に10 ヒトにおける肝臓の機能を検討する方法をもたらしものばかりではなく肝臓の機能を代替するいわゆる人工肝臓作成を可能とするものと考えられている。しかしながら、生体組織から分離したヒト正常肝細胞は継代培養が不可能である。細胞株として樹立することのできる細胞は本来の分化形質を持たないことが多く、細胞株が本来属していた組織の機能を正確に反映するものではない場合15 が多い。特に肝細胞において生体異物および／または内在性基質の代謝を行う酵素群その中でも特にチトクロームP450分子種に属する酵素群は、初代培養に於いて極めて短時間でその活性を失い、株化細胞でその性質を十分に保持しているものはこれまで見いだされていない(J. Dich et. al., Hepatology, 8, 39-45(1988))。このような観点から生体異物および／または内在性基質の代謝能を20 保持しかつ培養が可能な肝細胞がこれまで広く求められてきた。

しかしながら現在まで生体異物および／または内在性基質代謝に関与する機能を肝臓と同様に保持している培養細胞株は現在まで得られていない。特にチトクロームP450の活性は細胞の培養化により急速に失われることは広く認知されているため、株化された培養細胞にチトクロームP450を安定に発現させこれ25 をもって肝臓の代謝機能を代替させようとする試みが従来実施されてきた (M. Sawada et. al., Mutation Research 411, 19-43 (1998))。しかしながら先に

述べた理由からチトクロームP450を発現させる細胞株はヒト肝細胞由来であることが必須であり、またチトクロームP450活性発現のためにNADPH チトクロームP450還元酵素の活性が必要であり、さらに多くの酵素の発現が必要である。従って、ヒト肝の代謝機能を安定かつ安全に再現するにはその細胞がチトクロームP450のみならず種々の代謝に関与する酵素の活性を保持しているヒト培養肝細胞である必要がある。

代謝に関与する種々の酵素活性を保持した細胞にチトクロームP450発現した例としてはHepG2細胞にワクシニアウイルスを利用してP450を発現させた例 (Methods in Enzymology, T. Aoyama et. al in Methods in Enzymology 260巻、85-92ページ M. R. Waterman 監修 Academic Press 1991年) およびHepG2細胞にCYP2E1を発現させた例 (Y. Dai et al, Biochemistry 32 巻、6928-6937ページ 1993年) があげられる。前者は、その取り扱いに注意が必要であり実用上の障壁となっている。又後者については、単独にCYP2E1のみについての試みであり、肝に存在する多くのチトクロームP450についての試みは現在までにはない。従って、肝における生体異物および／または内在性基質の代謝に関与する酵素群を保持する培養細胞株を得ることができれば、該細胞株を用いて(1) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の解析、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解析、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析、(12) 肝に作用する生体異物および／また

- は内在性基質の解析方法等が可能になるばかりではなく、該細胞株を用いて(1) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索、(4)
- 5 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性発現をする物質の探索、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索
- 10 、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索等が可能となり該解析方法および／または該探索方法を用いて特定の化合物又はその塩等が得られる。

15 発明の開示

本発明の目的は、ヒト肝臓に由来する培養細胞株の提供であり、ヒト型チトクロームP450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 を安定に発現する細胞株を分離製造することにある。

- これら細胞は(1) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の
- 20 解析、(2) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発
- 25 現の解析、(8) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解

析、(10) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析、(11) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析、(12) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析等を可能とするばかりではなく、

- (1) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索、(2) 5 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索、(3) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の探索、(4) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性を発現する物質の探索、(5) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索、(6) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索、(7) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質の探索、(8) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索、(9) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索等を可能とし該解析方法および／または該スクリーニング方法を用いて特定の化合物又は 10 その塩等が得ることを可能とする。

本発明者らは、上記の課題に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、ヒト肝臓癌由来細胞株において、安定にヒト生体異物および／または内在性基質代謝に関与するチトクロームP450を安定かつ高活性で発現する安定形質転換株を樹立し、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

- 20 すなわち、本発明は、

- (1) ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の細胞株、
(2) ヒト型チトクロームP450がCYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1またはCYP3A4を安定に発現する上記(1)記載の細胞株、
25 (3) ヒト肝臓癌細胞がHepG2である上記(1)記載の培養細胞株、
(4) Hepc/1A1.4、Hepc/1A2.9、Hepc/2B6.68、Hepc/2C8.46、Hepc/2C9.1、

Hepc/2C19. 12、Hepc/2D6. 39、Hepc/2E1. 3-8またはHepc/3A4. 5である上記（１）記載の細胞株、

（５）上記（１）記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法、

（６）上記（１）記載の細胞株を用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、

（７）上記（１）記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f)生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質または(h)肝に作用する生体異物および／または内在性基質、(i)生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法、

（８）上記（７）記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩、

（９）上記（８）記載の化合物またはその塩を含有する医薬組成物、

(10) CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法、

(11) CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、

(12) CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f)生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質または(h)肝に作用する生体異物および／または内在性基

質、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法、

(13) 上記(12)記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩、および

- 5 (14) 上記(13)記載の化合物またはその塩を含有する医薬組成物などに関する。

図面の簡単な説明

図1は実施例4で示されたアセトアミノフェンの細胞毒性発現に関するMTT試験の結果を示す。図中、 \bigcirc はHepG2を、 \triangle はHepc/2E1.3-8を、 \bullet はHepG2+100 μ M BS0を、 \blacktriangle はHepc/2E1.3-8+100 μ M BS0を示す。

図2は実施例4で示されたアセトアミノフェンの細胞毒性発現に関するLDH漏出試験の結果を示す。図中、 \bigcirc はHepG2を、 \triangle はHepc/2E1.3-8を、 \bullet はHepG2+100 μ M BS0を、 \blacktriangle はHepc/2E1.3-8+100 μ M BS0を示す。

15 図3は実施例5で示されたベンズアントラセンの細胞毒性発現に関する試験の結果を示す。図中、 \bigcirc はHepG2を、 \bullet はHepc/1A1.4を示す。

図4は実施例6で示されたシクロフォスファミドの細胞毒性発現に関するMTT試験の結果を示す。図中、 \bigcirc はHepG2を、 \bullet はHepc/2B6.68を示す。

20 図5は実施例6で示されたシクロフォスファミドの細胞毒性発現に関するLDH漏出試験の結果を示す。図中、 \bigcirc はHepG2を、 \bullet はHepc/2B6.68を示す。

図6は実施例7で示されたケトコナゾールのCYP3A4活性阻害に関する試験の結果を示す。図中、 \square はケトコナゾールを示す。

図7は実施例8で示されたCYP2E1活性誘導に関する試験の結果を示す。

25

発明を実施するための最良の形態

本明細書中、生体異物とは、例えば薬物、食品添加物、環境汚染物質、化学製品全般などを意味し、内在性基質とは生体の中に存在するあらゆる物質を意味する。中でも薬物を中心とする生体異物の代謝に対しては薬物代謝などが好ましく用いられる。

- 5 用いられるヒト肝臓癌細胞は、ヒト肝臓癌に由来する培養細胞株（好ましくは、Hep G2）をヒト肝臓癌より分離して得ることができる。ここに、別途分離した種々のチトクロームP450をコードする遺伝子を安定に発現せしめる。

- チトクロームP450をコードするDNA断片を安定に発現せしめるには、例えば個々のチトクロームP450をコードするDNA断片を得、それを外来性のプロモーター
- 10 の支配下に置き発現せしめる。チトクロームP450をコードするDNA断片の塩基配列は、公開されているデータベースより得ることができる。この塩基配列をもとによりPCR法、ハイブリダイゼーションスクリーニング法などの公知の方法によりチトクロームP450をコードDNA断片を分離することが可能である。このようにして得られたDNA断片は、哺乳類の培養細胞において安定に外来遺伝子を発現
- 15 する形質転換株をもたらすベクターに導入し、形質転換用ベクターを作成する。作製したベクターは、公知の方法により肝臓細胞に導入される。形質転換株は、そのものに導入されたチトクロームP450の発現によりもたらされる酵素活性を検討することにより選択し、すぐれたクローンを選択する。さらに得られたクローンは、凍結保存の繰り返しによりその性質の安定性を確認できる。

- 20 外来性のプロモーターとしては、例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

「ヒト型チトクロームP450を安定に発現する」とは、

- ヒト型チトクロームP450の発現が一過性ではないこと、具体的には、細胞の
- 25 培養化（継代）により、チトクロームP450の活性が失われることがないことを意味する。また、ヒト型チトクロームP450を発現する細胞がチトクロームP450

のみならず種々の代謝に関与する酵素（具体的には、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼ等）が機能している細胞が好ましい。

- 5 肝の生体異物およびまたは内在性基質代謝に関与するチトクロームP450分子種としてはCYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4などがあげることができる。これらの酵素は、生体異物およびまたは内在性基質の代謝反応を行うばかりではなくその代謝産物の性状により生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、生体異物および／または
- 10 内在性基質代謝酵素の活性の促進、生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現、生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現、生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性発現、生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性発現等を生じせしめる。しかしながら、肝の生
- 15 体異物およびまたは内在性基質代謝に関与する機能は、単にチトクロームP450のみにより実施されるのではなくUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびチトクロームP450還元酵素などの種々の酵素の共同の働きに依存する
- 20 。

- 従って、チトクロームP450の発現により肝の機能を再現せしめるためにはその細胞はヒト由来の少なくともUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ、スルフォトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼ
- 25 が機能している細胞でなくてはならない。このような細胞の一つとしてヒト肝臓癌由来の培養細胞HepG2があげられる。HepG2細胞は、UDP-グルクロノシ

ルトランスフェラーゼ、スルフトランスフェラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、エポキシヒドラターゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、フラビンモノオキシゲナーゼおよびNADPH P450還元酵素が機能していることが知られている(J. Rueff et. al., Mutation Research, 353, 151-176 (1996))。以上
5 の観点から、本発明者らはHepG2においてチトクロームP450を安定に発現せしめることにより迅速かつ安価かつ安全かつ正確にヒト肝臓の機能を再現せしめることに成功した。

なかでも、Hepc/3A4.5、Hepc/2E1.3-8、Hepc/2C9.1、Hepc/2C8.46、Hepc/1A2.9、Hepc/1A1.4、Hepc/2B6.68、Hepc/2D6.39、Hepc/2A6L.9、
10 Hepc/2C19.12などが好ましく用いられる。

Hepc/3A4.5はCYP3A4の高活性発現細胞であり、Hepc/2E1.3-8はCYP2E1の高活性発現細胞であり、Hepc/2C9.1はCYP2C9の高活性発現細胞であり、Hepc/2C8.46はCYP2C8の高活性発現細胞であり、Hepc/1A2.9はCYP1A2の高活性発現細胞であり、Hepc/1A1.4はCYP1A1の高活性発現細胞であり、Hepc/2B6.68はCYP2B6の高活性発現細胞であり、Hepc/2D6.39はCYP2D6の高活性発現細胞であり、Hepc/2A6L.9はCYP2A6の高活性発現細胞であり、Hepc/2C19.12はCYP2C19の高活性発現細胞である。
15

さらに本発明は、上記のヒト型チトクロームp450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または
20 は内在性基質代謝に関与する酵素の解析方法、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法、(d)生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法、(f)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法、(g)
25 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の発現の解析方法、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の発現の解析方法、(i)

生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性発現の解析方法、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法、(k) 生体異物および／または内在性基質代謝に肝毒性発現の解析方法または(l) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法などに関する。

5 以下に上記(a)～(l)記載の各方法について説明する。

(a) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクローム p 4 5 0 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の解析が可能である(J. L. .Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp. 491-501 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp. 99-198 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1996)。具体的には、被検物質のチトクローム p 4 5 0 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することによる生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素の同定、被検物質の細胞への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することによる酵素反応機構の解析、基質特異性の解析などをあげることができる。

被検物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

(b) 生体異物および／または内在性基質代謝経路の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクローム P 4 5 0 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質の代謝経路の解析が

可能である(J. L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp. 491-501 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp. 99-198 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1996)。

5 被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(c) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露により生じた生体異物および／または内在性基質の構造の変化を解析することにより生体異物および／または内在性基質の代謝産物の

10 化学構造の解析が可能である(J. L. Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp. 491-501 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991、H. K. Kroemer ほか Methods in Enzymology vol. 272 pp. 99-198 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1996)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

15 (d) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露せしめた結果生じた生体異物および／または内在性基質の変換物質（いわゆる代謝産物）を採取し適切な方法で精製分離することにより生体異物および／または内在性基質の代謝産物の調製が可能である(J. L.

20 Napoli ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp. 491-501 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の解析方法

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来
25 の培養細胞株へ暴露することにより生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の阻害の解析が可能である(J. L. Napoli ほか Methods in Enzymology

vol. 206 pp. 491-501 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991)。具体的には、チトクロームP450酵素活性の阻害、タンパク量の減少、mRNAの減少などにより検出することが可能である。検出方法としては、各種P450に対応する酵素活性の測定、各種P450蛋白質に対応するウエスタンブローディング、各種P450 mRNAに対応するノザンハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR法など公知の手法を使用することができる。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(f) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株へ暴露し、生体異物および／または内在性基質代謝の酵素活性の上昇、酵素量の増加または酵素をコードする遺伝子の転写量の上昇などを検出することにより生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進の解析が可能である(J. Rueff ほかMutation Research 353(1996) 151-176)。具体的には、チトクロームP450酵素活性の上昇、タンパク量の増加、mRNAの増加を検出することで可能である。検出方法としては、各種P450に対応する酵素活性の測定、各種P450蛋白質に対応するウエスタンブローディング、各種P450 mRNAに対応するノザンハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR法など公知の手法を使用することができる。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の解析方法：

たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露により生体異物および／または内在性基質の代謝による細胞毒性の解析が可能である。具体的には、被検物質の暴露による細胞の形態の変化、MTTアッセイやトリパンブルー染色あるいはクリスタルバイオレット染色など公知の方法による生細胞数の変動、乳酸脱水素酵素などの細胞内酵素の漏出、細胞表層構造の変化あるいは細胞内酵素の変動などを観察することによ

り解析される(D. Wu ほか Journal of Biological Chemistry, 271, (1996) 23914-23919)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(h) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析方法：

- 5 たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、小核試験などに付すことより生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な評価系で
- 10 評価することにより染色体異常試験、小核試験、復帰突然変異試験などに付すことにより解析が可能である(J. Rueff ほかMutation Research 353(1996) 151-176, M. E. McManus ほか Methods in Enzymology vol. 206 pp. 501-508 Ed. by M. R. WatermanほかAcademic Press 1991))。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

- 15 (i) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、DNAの修飾などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由

20 来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な化学物質による発ガン評価系で評価することにより解析が可能である(J. Rueff ほかMutation Research 353(1996) 151-176, K. Kawajiri ほかCytochromes P450 metabolic and toxicological aspects pp77-98 ed. by C. Ioannides CRC press (1996))。

- 25 被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞を染色体異常試験、小核試験などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析が可能である。またさらに、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を適切な評価系で評価することにより染色体異常試験、小核試験、復帰突然変異試験などに付すことにより解析が可能である(J. Rueff ほかMutation Research 353(1996) 151-176)。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

10 (k) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性の解析方法：

たとえば、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露し、細胞毒性の発現を観察することにより、あるいは、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性を解析することが可能である。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

(l) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法：

20 たとえば、被検物質のチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株への暴露による細胞の変化の発現を観察することにより、あるいは、被検物質をチトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより肝への作用の発現を解析することが可能である。

被検物質としては、上記と同様のものなどが用いられる。

- さらに本発明は、上記のヒト型チトクローム p 4 5 0 を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株を用いることを特徴とする (A) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(B) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(C) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(D) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(E) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(F) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(G) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性を発現する物質または (H) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質、
- 10 (I) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法およびこれらの探索方法によって得られる化合物またはその塩を提供する。
- (A) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質の探索方法としては、上記 (e) に記載の生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害の
- 15 解析方法に従って解析し、例えば、チトクローム P450 酵素活性の阻害、タンパク量の減少、mRNA の減少などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質として選択することが可能である。
- (B) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質の探索方法としては、上記 (f) に記載の生体異物および／または内在性基質代謝酵素の
- 20 活性の促進の解析方法に従って解析し、例えば、チトクローム P450 酵素活性の促進、タンパク量の増加、mRNA の増加などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質として選択することが可能である。
- (C) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質の
- 25 探索方法としては、上記 (g) に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性の解析方法に従って解析し、例えば、被検物質の暴露による細胞

の形態の変化、生細胞数の変動、細胞内酵素の漏出、細胞表層構造の変化あるいは細胞内酵素の変動などをもたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質として選択することが可能である。

5 (D) 生体異物およびまたは内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質の探索方法としては、上記(h)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性の解析方法に従って解析し、例えば、染色体異常試験、小核試験などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性をもたらす被検物質を生体異物およびまたは内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質として選択することが可能である。

10 (E) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質の探索方法としては、上記(i)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性の解析方法に従って解析し、例えば染色体異常試験、DNAの修飾などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性を
15 もたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質として選択することが可能である。

(F) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質の探索方法としては、上記(j)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性の解析方法に従って解析し、例えば染色体異常試験、小核試験などに付すことにより生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性を
20 もたらす被検物質を生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質として選択することが可能である。

(G) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質の探索方法としては、上記(k)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性の解析方法に従って解析し、例えば、被検物質を細胞に暴露したのち
25 、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより生体異物

および／または内在性基質代謝による肝毒性をもたらす被験物質を生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質として選択することが可能である。

(H) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の探索方法としては、上記

- 5 (I) に記載の肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法に従って解析し、例えば、被検物質を細胞に暴露したのち、細胞により変化した被検物質を他の肝細胞、肝切片、摘出肝または、実験動物へ投与しそれによる細胞、組織、生体の変化を観察することにより肝に作用する生体異物および／または内在性基質を探索することが可能である。

- 10 (I) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質（いわゆるプロドラッグを含む）の探索方法としては、上記(c)に記載の生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造の解析方法に従って解析し、該代謝産物の生理活性を観察することにより探索することが可能である。

- 15 上記 (A) ～ (I) の探索方法により得られる化合物またはその塩は、上記した作用・性質などをもたらす被験物質から選ばれた化合物またはその塩であり、肝臓の生体異物の代謝異常に係る疾患（例えば、肝機能不全症など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬組成物として使用することができる。

- 20 該探索方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フ
25 マル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

該探索方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、公知の製造法またはそれに準じた方法で製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、肝機能不全症の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、肝機能不全症の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

上記の製剤の剤形としての具体例としては、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、カプセル剤（マイクロカプセルを含む）、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、注射剤、吸入剤、軟膏などが用いられる。これらの製剤は常法（例えば日本薬局方記載の方法など）に従って調製される。

該製剤において、上記のスクリーニング方法で得られた化合物またはその塩の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して0.01ないし100重量%、好ましくは0.1ないし50重量%、さらに好ましくは0.5ないし20重量%程度である。

具体的には、錠剤の製造法は、医薬品をそのまま、賦形剤、結合剤、崩壊剤

もしくはそのほかの適当な添加剤を加えて均等に混和したものを、適当な方法で顆粒とした後、滑沢剤などを加え、圧縮成型するかまたは、医薬品をそのまま、または賦形剤、結合剤、崩壊剤もしくはそのほかの適当な添加剤を加えて均等に混和したものを、直接圧縮成型して製するか、またはあらかじめ製した

5 顆粒をそのまま、もしくは適当な添加剤を加えて均等に混合した後、圧縮成型しても製造することもできる。また、本剤は、必要に応じて着色剤、矯味剤などを加えることができる。さらに、本剤は、適当なコーティング剤で剤皮を施すこともできる。

注射剤の製造法は、医薬品の一定量を、水性溶剤の場合は注射用水、生理食

10 塩水、リンゲル液など、非水性溶剤の場合は通常植物油などに溶解、懸濁もしくは乳化して一定量とするか、または医薬品の一定量を取り注射用の容器に密封して製することができる。

経口用製剤担体としては、例えばデンプン、マンニット、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの製剤分野において常用されている物質が用いられる。注射用担体としては、例えば蒸留水、生理食塩水、グル

15 コース溶液、輸液剤などが用いられる。その他、製剤一般に用いられる添加剤を適宜添加することもできる。

さらに本発明は、

① CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1

20 およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体

25

異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法、

5 ② CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法、

③ CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1
10 およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝
15 毒性を発現する物質、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質、(h) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質または(i) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいは
20 それ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法、

④ 上記③記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩（医薬組成物）なども提供する。

「(a) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b) 生体異物
および／または内在性基質代謝経路、(c) 生体異物および／または内在性基質代
25 謝産物の化学構造、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f) 生体異物および

- ／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法」、「生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法」、「(a) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性を発現する物質、(h) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質または(i) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法」および「(a) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性を発現する物質、(h) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質または(i) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法によって得られる化合物またはその塩（医薬組成物）」とは上記と同様の意味で用いられる。

「CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1
およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の
培養細胞株を2種以上用いる」ことを特徴とする上記の解析方法、調製方法、
探索方法は、CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、
5 CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4の内のいずれか単独の酵素を発現する細胞株を用
いる場合に比べ、より生体内に近い状態での解析、調製、探索を可能とする。

また、該細胞株を2種以上用いる場合には、それぞれの細胞株を同時に用い
てもよいし、別々に用いて、それぞれの解析、調製、探索結果を比較してもよ
い。

- 10 後述の実施例で得られた細胞株はHepc/3A4. 5, Hepc/2E1. 3-8, Hepc/2C9. 1,
Hepc/2C8. 46, Hepc/1A2. 9, Hepc/1A1. 4は1999年2月10日から大阪府大阪
市淀川区十三本町2-17-85、財団法人・発酵研究所(IFO)において、それ
ぞれ寄託番号IFO 50502, 50503, 50504, 50505, 50506, 50507として、200
0年4月12日から茨城県つくば市東1-1-3、通商産業省工業技術院生命
15 工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-7120, FERM BP-7121, FERM
BP-7122, FERM BP-7123, FERM BP-7124, FERM BP-7125として寄託されている。
Hepc/2B6. 68, Hepc/2D6. 39はそれぞれ平成1999年2月15日から大阪府大阪
市淀川区十三本町2-17-85、財団法人・発酵研究所(IFO)において寄託番
号IFO 50508, 50509として、2000年4月12日から茨城県つくば市東1-
20 1-3、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)にそれぞ
れ寄託番号FERM BP-7126, FERM BP-7127として寄託されている。また、
Hepc/2A6L. 9, Hepc/2C19. 12はそれぞれ1999年2月15日から大阪府大阪市
淀川区十三本町2-17-85、財団法人・発酵研究所(IFO)において寄託番号
IFO 50511, 50512として、2000年4月12日から茨城県つくば市東1-1
25 -3、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)にそれぞ
れ寄託番号FERM BP-7128, FERM BP-7129として寄託されている。

実施例

以下本発明の実施例について詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。また、遺伝子操作の手法は特に断りのない限りサムブルーク (Sambrook) らのマニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス) などによる一般的な方法を用いた。

10 実施例 1 チトクロームP450をコードするDNA断片のクローン化および発現ベクターの作成

ヒトチトクロームP450をコードするDNA断片のクローン化はヒト成人肝臓に由来する相補DNA(cDNA)ライブラリーから、確立された方法である polymerase chain reaction (以下PCR) 法によりクローン化した。クローン化するヒトチトクロームP450のcDNA配列はジーンバンク (GeneBank) のデータベースから入手可能である。GeneBankにおける受け入れ番号はCYP1A1はK03191、CYP1A2はM55053あるいはM38504、CYP2A6はM33318あるいはM33316、CYP2B6はM29874あるいはJ02864、CYP2C8はM17397あるいはJ03472、CYP2C9はM61857あるいはJ05326、CYP2C19はM61854あるいはJ05326、CYP2D6はX08006あるいはY00300、CYP2E1はJ02625、CYP3A4はJ04449となっている。

20 クローン化した個々のcDNAは、pcDNA3.1(+)ベクター(Invitrogen Co.) CMV (サイトメガロウイルス) のエンハンサー・プロモーターの下流にプロモーターの機能する方向に合わせて導入しCYP1A1を導入した1A1/pcDNA3.1(+), CYP1A2を導入した1A2/pcDNA3.1(+), CYP2A6を導入した2A6/pcDNA3.1(+), CYP2B6を導入した2B6/pcDNA3.1(+), CYP2C8を導入した2C8/pcDNA3.1(+), CYP2C9を導入した2C9/pcDNA3.1(+), CYP2C19を導入した2C19/pcDNA3.1(+), CYP2D6を導入した2D6/pcDNA3.1(+), CYP2E1を導入した2E1/pcDNA3.1(+), CYP3A4を導入した

3A4/pcDNA3.1(+)を得た。

実施例2 チトクロームP450高活性発現細胞の選択

HepG2 は、10% FCS (牛胎児血清 fetal calf serum) (Bio Whittaker)を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) 培地で維持した。HepG2 を60mm
5 ディッシュに播種し、50~60%コンフルエントになるまでCO₂ インキュベーター
内で培養した後、リポフェクタミン試薬 (GIBCO BRL) を用いて2 μ gの
1A1/pcDNA3.1(+), 1A2/pcDNA3.1(+), 2A6/pcDNA3.1(+), 2B6/pcDNA3.1(+),
2C8/pcDNA3.1(+), 2C9/pcDNA3.1(+), 2C19/pcDNA3.1(+), 2D6/pcDNA3.1(+),
10 2E1/pcDNA3.1(+), あるいは3A4/pcDNA3.1(+))をトランスフェクトした。2日間
10% FCSを含むDMEM培地で培養後、500 μ g/ml G418 (GIBCO BRL)、10% FCSを含
むDMEM培地に置換し、3~4日毎に新しい培地に交換し、G418耐性株をクロー
ニングした。得られたG418耐性株は200 μ g/ml G418 (GIBCO BRL)、10% FCSを
含むDMEM培地で維持した。得られたG418耐性株のおののチトクロームP450
15 活性を以下に記載の方法で測定し活性の高い細胞株を測定し、高活性発現細胞
を選択した。

(1) CYP1A1およびCYP1A2発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

エトキシレゾルフィン (Molecular Probes) はDMSO (dimethyl sulfoxideジ
20 メチルスルフォキサイド) (和光純薬) で2mM になるように希釈した。次に、
これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO
BRL) で500 μ M になるように希釈した。

CYP1A1 あるいは CYP1A2発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、
コンフルエントになるまで CO₂インキュベーター内で培養した。培養後、培地を
25 吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した
後、上記で希釈した500 μ Mエトキシレゾルフィンを500 μ l/ウェル添加した。暗

所で37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液300 μ lにメタノール（和光純薬）1800 μ lを添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、分光蛍光光度計にて、励起波長550nm 蛍光波長586nmの蛍光強度を測定し、生成したレゾルフィン（Molecular Probes）の標準物質は、Molecular Probesより購入したものを用いた。

得られたCYP1A1あるいはCYP1A2活性発現株のなかからCYP1A1高発現株としてHepc/1A1. 4株を、CYP1A2高発現株としてHepc/1A2. 9株を各々得た。

(2) CYP2A6 発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

10 クマリン（和光純薬）はメタノール（和光純薬）で50mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS（Bio Whittaker）を含むフェノールレッド不含DMEM培地（GIBCO BRL）で500 μ Mになるように希釈した。

CYP2A6発現細胞を12ウェルプレート（Falcon）に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した500 μ Mクマリンを500 μ l/ウェル添加した。37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液を0.1M Tris-HCl（pH 7.4）で10倍に希釈し、分光
15 蛍光光度計にて、励起波長390nm 蛍光波長440nmの蛍光強度を測定し、生成した7-ヒドロキシクマリンを定量した。7-ヒドロキシクマリンの標準物質は、
20 Extrasyntheseより購入したものを用いた。

得られたCYP2A6活性発現株のなかからCYP2A6高発現株としてHepc/2A6L. 9株を得た。

(3) CYP2B6発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

25 7-エトキシクマリン（Molecular Probes）はDMSO（和光純薬）で10mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS（Bio Whittaker）を含むフェノールレ

ド不含DMEM培地 (GIBCO BRL)で500 μ M になるように希釈した。

- CYP2B6発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した500 μ M 7-エトキシクマリンを500 μ l/ウェル添加した。37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液を0.1M Tris-HCl (pH 7.4)で10倍に希釈し、分光蛍光光度計 (日立分光蛍光光度計 F-2000) にて、励起波長390nm 蛍光波長440nmの蛍光強度を測定し、生成した7-ヒドロキシクマリンを定量した。7-ヒドロキシクマリンの標準物質は、Extrasyntheseより購入したものをを用いた。

得られたCYP2B6活性発現株のなかからCYP2B6高発現株としてHepc/2B6. 68株を得た。

(4) CYP2C8発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

- タキソール (ULTRAFINE chemicals) はメタノール (和光純薬) で10mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL)で30 μ M になるように希釈した。

- CYP2C8発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した30 μ Mタキソールを500 μ l/ウェル添加して37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル (和光純薬) を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。これを、HPLCにて反応液中に生じた6 α -ヒドロキシパクリタキセルを定量した。

- カラムは、Capcell Pak C18 AG120 (5 μ m, 4.6mm ϕ x 250mm, 資生堂)を用いた。移動相としては、40%アセトニトリル (HPLC用試薬、和光純薬) を用いた。

反応液 40 μ l をインジェクションし、流速1.0ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。タキソール および 6 α -ヒドロキシパクリタキセルは、230nm（吸光度）で検出した。標準物質として、10 μ Mタキソール および 5 μ M 6 α -ヒドロキシパクリタキセル（Gentest）40 μ lをインジェクションした。

得られたCYP2C8活性発現株のなかからCYP2C8高発現株としてHepc/2C8.46株を得た。

(5) CYP2C9発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

10 トルブタミド（Research Biochemicals International）はメタノール（和光純薬）で50mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS（Bio Whittaker）を含むフェノールレッド不含DMEM培地（GIBCO BRL）で500 μ Mになるように希釈した。

15 CYP2C9発現細胞を12ウェルプレート（Falcon）に播種し、コンフルエントになるまで CO₂インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した500 μ Mトルブタミドを500 μ l/ウェル添加して37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル（和光純薬）を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。反応液中に生じたヒドロキシトルブタミドをHPLCにて定

20 量した。

カラムは、Inertsil ODS-2（5 μ m、4.6mm ϕ x 150mm、GL Science）を用いた。移動相としては、10mM Acetate Buffer（pH4.3）とアセトニトリル（HPLC用試薬、和光純薬）を72:28 v/vで混合したものをを用いた。反応液40 μ lをインジェクションし、流速1.0ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出

25 させた。トルブタミドおよびヒドロキシトルブタミドは、230nm（吸光度）で検出した。標準物質として、100 μ Mトルブタミド および10 μ Mヒドロキシトルブ

タミド（住化分析センター）40 μ l をインジェクションした。

得られたCYP2C9活性発現株のなかからCYP2C9高発現株としてHepc/2C9.1株を得た。

5 (6) CYP2C19発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

(S)メフェニトイン（住化分析センター）はメタノール（和光純薬）で10mMになるように希釈した。次に、これを2%FCS (Bio Whittaker) を含むフェノールレッド不含DMEM培地（GIBCO BRL）で100 μ Mになるように希釈した。

- 10 CYP2C19発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまでCO₂インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した100 μ M (S)メフェニトインを500 μ l/ウェル添加して37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル（和光純薬）を添加・混合後、不溶性物質を遠心除去した。これを、HPLCにて反応液中に生じた4'-ヒドロキシメフェニトインを定量した。
- 15

- カラムは、Capcell Pak C18 AG120 (5 μ m、4.6mm ϕ x 250mm、資生堂)を用いた。移動相としては、0.05M KH₂PO₄ (pH4.0)とアセトニトリル（HPLC用試薬、和光純薬）を74:26 v/vで混合したものをを用いた。反応液 40 μ l をインジェクションし、流速0.8ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。
- 20
- (S)メフェニトインおよび4'-ヒドロキシメフェニトインは、204nm（吸光度）で検出した。標準物質として、50 μ M (S)メフェニトイン および 5 μ M 4'-ヒドロキシメフェニトイン（住化分析センター）40 μ l をインジェクションした。

- 得られたCYP2C19活性発現株のなかからCYP2C19高発現株としてHepc/2C19.12株を得た。
- 25

(7) CYP2D6発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

ブフラロール（住化分析センター）は蒸留水で20mMになるように希釈した。次に、これを2% FCS（Bio Whittaker）を含むフェノールレッド不含DMEM培地（GIBCO BRL）で200 μ M になるように希釈した。

- 5 CYP2D6発現細胞を12ウェルプレート（Falcon）に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した200 μ Mブフラロールを500 μ l/ウェル添加して37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、HPLCにて反応液中に生じた1'-ヒドロキシブフラロールを定
- 10 量した。

- カラムは、Inertsil ODS (5 μ m, 4.6mm ϕ x 250mm, GL Science)を用いた。移動相としては、1mM過塩素酸（和光純薬）を含む30%アセトニトリル溶液（HPLC用試薬、和光純薬）を用いた。反応液を蒸留水で100倍に希釈し、そのうちの 40 μ l をインジェクションし、流速1.0 ml/min、カラム温度50℃で先に示した移
- 15 動相を用いて溶出させた。ブフラロール および ヒドロキシブフラロールは、励起波長252nm 蛍光波長302nmで検出した。標準物質として、100pMブフラロールおよび 10pM 1'-ヒドロキシブフラロール（住化分析センター）40 μ l をインジェクションした。

- 得られたCYP2D6活性発現株のなかからCYP2D6高発現株としてHepc/2D6. 39株
- 20 を得た。

(8) CYP2E1発現細胞 の活性の測定と高活性発現細胞の選択

- パラニトロフェノール（和光純薬）はDMSO（和光純薬）で2mM になるように希釈した。次に、これを2% FCS（Bio Whittaker）を含むフェノールレッド不含
- 25 DMEM培地（GIBCO BRL）で500 μ M になるように希釈した。

2E1発現細胞を12ウェルプレート（Falcon）に播種し、コンフルエントになる

まで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 500 μ M パラニトロフェノールを 500 μ l/ウェル添加した。37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液 100 μ l に 2N NaOH (和光純薬) 50 μ l を

5 添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、540nm～620nmの吸収を測定し、生成した4-ニトロカテコールを定量した。4-ニトロカテコールの標準物質は、和光純薬より購入したものをを用いた。

得られたCYP2E1活性発現株のなかからCYP2E1高発現株としてHepc/2E1. 3-8株を得た。

10

(9) CYP3A4発現細胞の活性の測定と高活性発現細胞の選択

テストステロン (和光純薬) はメタノール (和光純薬) で 10mM になるように希釈した。次に、これを 2% FCS (Bio Whittaker) を含む、フェノールレッド不含DMEM培地 (GIBCO BRL) で 100 μ M になるように希釈した。

15 CYP3A4発現細胞を12ウェルプレート (Falcon) に播種し、コンフルエントになるまで CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、上記で希釈した 100 μ M テストステロンを 500 μ l/ウェル添加して 37℃で反応させた。各ウェルから反応液を回収し、等量のアセトニトリル (和光純薬) を添加・混合後

20 、不溶性物質を遠心除去した。これを、HPLCにて反応液中に生じた6 β -ヒドロキシテストステロンを定量した。

カラムは、Capcell Pak C18 AG120 (5 μ m、4.6mm ϕ x 250mm、資生堂) を用いた。A液として、40% メタノール (HPLC用試薬、和光純薬)、3.5% アセトニトリル溶液 (HPLC用試薬、和光純薬) を、B液として40% メタノール、20% アセトニトリル溶液を用いた。0～20分まではB液の0～100% の直線的なグラディエント、20～30分はB液100%、それ以後はA液100%となるようなプログラムを作成

25

した。反応液 40 μ l をインジェクションし、流速1.0ml/min、カラム温度40℃で先に示した移動相を用いて溶出させた。テストステロン および 6 β -ヒドロキシテストステロンは、254nm（吸光度）で検出した。標準物質として、50 μ M テストステロン および 5 μ M 6 β -ヒドロキシテストステロン（住化分析センター） 40 μ l をインジェクションした。

得られたCYP3A4活性発現株のなかからCYP3A4高発現株としてHepc/3A4. 5株を得た。

実施例3 チトクロームP450高発現株の速度論的解析

- 10 実施例2で得られた各チトクロームP450高活性発現株に、種々の濃度の基質を実施例2記載の酵素活性測定法に従って反応させた。ラインウェーバー・バークプロットをとり、そのX軸 および Y軸切片から、 K_m 値 および V_{max} 値を求めた。結果を表1に示した。

表 1

| CYP 分子種 | 形質転換株 | 酵素活性 | 速度定数 | |
|---------|--------------|----------------------------|---------------|--------------------|
| | | | Km (μ M) | Vmax (pmol/min/mg) |
| CYP1A1 | Hepc/1A1.4 | 7-エトキシレゾルフィン O-脱エチル化活性 | 0.25 | 56 |
| CYP1A2 | Hepc/1A2.9 | 7-エトキシレゾルフィン O-脱エチル化活性 | 0.72 | 1.6 |
| CYP2A6 | Hepc/2A6L.9 | クマリン 7-ヒドロキシ活性 | 11.1 | 412 |
| CYP2B6 | Hepc/2B6.68 | 7-エトキシクマリン O-脱エチル化活性 | 81 | 80 |
| CYP2C8 | Hepc/2C8.46 | タキソール 6-ヒドロキシ活性 | 7.4 | 0.009 |
| CYP2C9 | Hepc/2C9.1 | トルブタミド 4-ヒドロキシ活性 | 77 | 23 |
| CYP2C19 | Hepc/2C19.12 | (S)-メフェニトイン 4-ヒドロキシ活性 | 8.26 | 140 |
| CYP2D6 | Hepc/2D6.39 | ブフラロール 1'-ヒドロキシ活性 | 17 | 14 |
| CYP2E1 | Hepc/2E1.3-8 | p-ニトロフェノール ヒドロキシ活性 | 88 | 120 |
| CYP3A4 | Hepc/3A4.5 | テストステロン 6 β -ヒドロキシ活性 | 96 | 71 |

実施例4 アセトアミノフェンのCYP2E1発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

1. MTTアッセイ

- 5 HepG2 あるいはCYP2E1発現細胞 (Hepc/2E1.3-8) 細胞 (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したアセトアミノフェン (和光純薬) とともにCO₂ インキュベーター内で培養した。グルタチオン抱合を停止させる実験では、ここにL-Buthionine [S, R]-Sulfoximine (BSO, Sigma) を最終濃度 100 μ M になるように添加した。4日間培養した後、各ウェルにPBS (Flow) で
- 10 1mg/ml に調製した 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma)溶液 20 μ l を添加して37℃で3時間インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μ l を添加して37℃で一晩インキュベートした後、590nm の吸収を測定した。結果を図1に示す。

15 2. LDH (lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素) 漏出の測定

- MTTアッセイ実施時と同じプレートデザインで2枚ずつプレートを用意した (培養上清中のLDH活性測定用と培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性 測定用)。3日間CO₂インキュベーター内で培養後、1枚のプレート (培養上清中のLDH活性測定用) の各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。一方、他方のプレート (培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用) の各ウェルに10 μ lの10%Triton X100 (和光純薬) を添加・攪拌し、37℃で45分インキュベートした。1500 rpm 5分間遠心後、各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。これらのプレートの各ウェルのLDH
- 25 活性をCytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) にて測定した。吸光度の測定には、マルチスキャンMS-UVを用いた。培養上清中のLDH

活性 / (培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性) をLDH漏出率とした。結果を図2に示す。

結果 (図1、図2)

アセトアミノフェンが大量に存在すると、硫酸抱合の律速因子である活性硫酸の枯渇が起こる。グルクロン酸抱合は用量が大きい反応速度に限界があるため、P450によってN水酸化がおこる。N水酸化体から生成する活性中間体 Nアセチルベンゾキノニイミンは、通常グルタチオン抱合により解毒される。しかし、グルタチオンが枯渇すると、この活性中間体が肝臓の高分子と共有結合して肝細胞の壊死をおこすことが知られている (M. J. J. Ronis ほか
10 Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects 211-240ページ、監修C. Ioannides ほか CRC Press 1996年)。

アセトアミノフェンは、HepG2 および Hepc/2E1. 3-8細胞からLDHをわずかに漏出させた。ここにBS0を共存させて細胞内のグルタチオンを枯渇させると、Hepc/2E1. 3-8細胞においてはアセトアミノフェンに対する感受性が約4倍増加して、より低濃度で濃度依存的にLDHを漏出させた。HepG2 ではBS0の共存効果は認められなかった (図2)。一方、MTT法でもアセトアミノフェンはHepG2 および Hepc/2E1. 3-8細胞のMTT活性をわずかに減少させた。ここにBS0を共存させると、Hepc/2E1. 3-8細胞においてアセトアミノフェンに対する感受性が増加して、より低濃度で濃度依存的なMTT 活性の減少が認められた (図1)。
20 Hepc/2E1. 3-8細胞が発現しているCYP2E1 活性によってアセトアミノフェンは代謝されるが、代謝産物はグルタチオン抱合によって解毒される。ところが、BS0 を作用させてグルタチオンを枯渇させると、生じた代謝中間体によって細胞毒性が発揮されたと考えられる。Hepc/2E1. 3-8細胞はCYP2E1 活性を持っているだけでなく、グルタチオントランスフェラーゼ活性も有していることが示さ
25 れる。

実施例5 ベンズアントラセンのCYP1A1発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

CYP1A1発現細胞 (Hepc/1A1.4) (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培
5 地で所定の濃度に希釈したベンズアントラセン (Sigma)とともに5% FCS を含む
DMEM培地でCO₂ インキュベーター内で培養した。4日間培養した後、各ウェルに
PBS (Flow) で1mg/mlに調製した MTT (Sigma)溶液 20 μ l を添加して37℃で3
時間インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μ
l を添加して37℃で一晩インキュベートした後、590nm の吸収を測定した。結
10 果を図3に示す。

結果 (図3)

ベンズアントラセンは、CYP1A1 活性によって代謝され、生じた代謝中間体によ
って細胞毒性、発ガン性、突然変異誘発が生じることが知られている (K.
Kawajiri ほか Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects 77-
15 97ページ、監修C. Ioannides ほか CRC Press 1996年)。HepG2に比べて
Hepc/1A1.4細胞においてベンズアントラセンの濃度依存的に強いMTT 活性の減
少が認められた。Hepc/1A1.4細胞が発現しているCYP1A1 活性によってベンズア
ントラセンが代謝され、生じた代謝中間体によって細胞毒性が発揮されたこと
を示す。

20

実施例6 シクロフォスファミドのCYP2B6発現細胞による代謝活性化と細胞毒性の発現

実験方法

1. MTTアッセイ

25 CYP2B6発現細胞 (Hepc/2B6.68) (4×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM
培地で所定の濃度に希釈したシクロフォスファミド (Sigma)とともに5% FCSを

含むDMEM培地でCO₂ インキュベーター内で培養した。5日間培養した後、各ウェルにPBS (Flow) で1mg/mlに調製した MTT (Sigma)溶液 20 μ l を添加して37℃で3時間インキュベートした。次いで、各ウェルに10% SDS、0.01N HCl 溶液 100 μ lを添加して37℃で一晩インキュベートした後、590nm の吸収を測定した。

5 結果を図4に示す。

2. LDH 漏出の測定

MTTアッセイ実施時と同じプレートデザインで2枚ずつプレートを用意した（培養上清中のLDH活性測定用と培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用）。4日間CO₂ インキュベーター内で培養後、1枚のプレート（培養上清中のLDH活性測定用）の各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。一方、他方のプレート（培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性測定用）の各ウェルに10 μ lの10% Triton X100 を添加・攪拌し、37℃で45分インキュベートした。1500rpm 5分間遠心後、各ウェルから10 μ lの培養上清を採取して別の96ウェルプレートに添加し、さらに蒸留水40 μ lを添加した。これらのプレートの各ウェルのLDH活性を Cytotox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega) にて測定した。吸光度の測定には、マルチスキャンMS-UVを用いた。培養上清中のLDH活性 / （培養上清中のLDH活性 + 細胞中のLDH活性）をLDH漏出率とした。結果を図5に示す。

20 結果（図4、5）

シクロフォスファミドは4位が水酸化された後、非酵素的な分解によって生成したホスホラミドやアクロレインがアルキル化剤として作用し、肝細胞内の高分子成分と共有結合が引き金となって肝細胞傷害を引き起こすと考えられている（K. H. Thomas ほかCancer. research 53巻 5629-5637ページ1993年）。

25 シクロフォスファミドは、Hepc/2B6. 68細胞において2mMまでの濃度で濃度依存的にLDHを漏出させ、それ以後の濃度でプラトーに達した。シクロフォスファミ

ドはHepG2においても若干の細胞毒性が認められた（図4）。一方、MTT法でもHepc/2B6.68細胞においてシクロフォスファミドの濃度依存的にMTT活性の減少が認められた（図5）。Hepc/2B6.68細胞が発現しているCYP2B6活性によってシクロフォスファミドが代謝され、生じた代謝中間体による細胞毒性が示された。

実施例7 CYP3A4活性の阻害の解析

実験方法

12穴マイクロプレートにHepc/3A4.5細胞を播種し、コンフルエントになるまで培養した。フェノールレッド不含DMEM培地で2回洗浄後、500 μ lの2% FCSを含むフェノールレッド不含DMEM培地で希釈した種々の濃度のケトコナゾール（Biomol Research Lab.）を添加して37℃で4時間インキュベーションした。フェノールレッド不含DMEM培地で2回洗浄後、500 μ lの2% FCSを含むフェノールレッド不含DMEM培地で希釈した最終濃度100 μ Mのテストステロンを添加した。37℃で1時間インキュベーションし、上清を回収した。等量のアセトニトリルを添加・混合後、不溶性物質を遠心除去したものを試料とした。得られた試料は、実施例2の(9)に示した方法でHPLCを用いて6 β -ヒドロキシテストステロンを定量した。

実験結果は薬物無添加時の6 β -ヒドロキシテストステロン生成量を100%とした相対値で示した（図6）。

ケトコナゾールは、強いCYP3A4阻害剤として知られている（S. J. BaldwinほかXenobiotica 25巻 261-270ページ1995年）。ケトコナゾールの濃度に依存してHepc/3A4.5細胞におけるCYP3A4活性（テストステロン6 β -水酸化活性）は阻害された（図6）。ケトコナゾールのIC₅₀は、0.3 μ M以下であった。

実施例8 CYP2E1活性誘導の解析

実験方法

Hepc/2E1. 3-8細胞 (5×10^5 cells/ml) は、5% FCS を含むDMEM培地で所定の濃度に希釈したエタノール、DMSO(ジメチルスルフォキシド) (和光純薬) とともに12穴マイクロプレートに播種し、CO₂ インキュベーター内で3日間培養した。培地を吸引し、フェノールレッド不含DMEM培地でプレートに付着した細胞を洗浄した後、500 μ Mパラニトロフェノールを500 μ l/ウェル添加した。37℃で反応させた後、各ウェルから反応液を回収した。反応液100 μ lに2N NaOH (和光純薬) 50 μ lを添加し、不溶性物質等を遠心除去した後、マルチスキャンMS-UV (ラボシステムズ) にて、540nm~620nmの吸収を測定し、生成した4-ニトロカテコールを定量した。

実験結果 (図7)

エタノール、DMSO(ジメチルスルフォキシド) 添加によりにより酵素活性が上昇し細胞内CYP2E1が誘導を受けることが示されており (M. J. J. Ronis ほか Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects 211-239ページ、監修C. Ioannides ほか CRC Press 1996年)、本実施例においてもこのことが示された。

産業上の利用可能性

本発明のヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌由来の培養細胞株は、(a) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h) 生体異物および／または内在性基質代謝によ

る発ガン性、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析、生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製などのために有用である。

請求の範囲

1. ヒト型チトクロームP450を安定に発現するヒト肝臓癌細胞由来の培養細胞株。
2. ヒト型チトクロームP450がCYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1またはCYP3A4を安定に発現する請求項1記載の細胞株。
3. ヒト肝臓癌細胞がHepG2である請求項1記載の細胞株。
4. Hepc/1A1. 4、Hepc/1A2. 9、Hepc/2B6. 68、Hepc/2C8. 46、Hepc/2C9. 1、Hepc/2C19. 12、Hepc/2D6. 39、Hepc/2E1. 3-8またはHepc/3A4. 5である請求項1記載の細胞株。
5. 請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b)生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c)生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f)生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g)生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h)生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i)生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j)生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k)肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法。
6. 請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法。
7. 請求項1記載の細胞株を用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物および／または内在性基質代謝により

遺伝毒性を発現する物質、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性を発現をする物質、(h) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質または

5 (i) 生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法。

8. 請求項7記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩。

9. 請求項8記載の化合物またはその塩を含有する医薬組成物。

- 10 10. CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a) 生体異物および／または内在性基質代謝に関与する酵素、(b) 生体異物および／または内在性基質代謝経路、(c) 生体異物および／または内在性基質代謝産物の化学構造、(d) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の阻害、(e) 生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性の促進、(f) 生体異物および／または内在性基質代謝による細胞毒性、(g) 生体異物および／または内在性基質代謝による遺伝毒性、(h) 生体異物および／または内在性基質代謝による発ガン性、(i) 生体異物および／または内在性基質代謝による変異原性、(j) 生体異物および／または内在性基質代謝による肝毒性、または(k) 肝に作用する生体異物および／または内在性基質の解析方法。
- 15 20

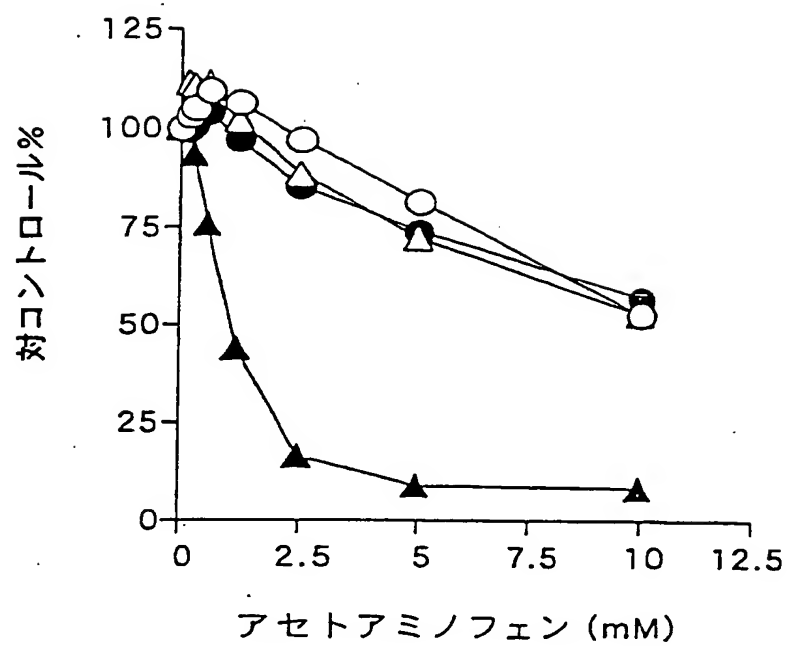
11. CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする生体異物および／または内在性基質代謝産物の調製方法。

- 25 12. CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1およびCYP3A4のいずれか1個または2個以上を安定に発現するヒト肝臓

- 由来の培養細胞株を2種以上用いることを特徴とする(a)生体異物および／または内在性基質代謝酵素を阻害する物質、(b)生体異物および／または内在性基質代謝酵素の活性を促進する物質、(c)生体異物および／または内在性基質代謝により細胞毒性を発現する物質、(d)生体異物およびまたは内在性基質代謝により遺伝毒性を発現する物質、(e)生体異物および／または内在性基質代謝により発ガン性を発現する物質、(f)生体異物および／または内在性基質代謝により変異原性を発現する物質、(g)生体異物および／または内在性基質代謝により肝毒性発現をする物質、(h)肝に作用する生体異物および／または内在性基質または(i)生体異物および／または内在性基質代謝により、新たな生理活性を獲得あるいはそれ自体のもつ生理活性を増大あるいは減弱する物質の探索方法。
- 5
- 10
13. 請求項12記載の方法を用いて得られる化合物またはその塩。
14. 請求項12記載の化合物またはその塩を含有する医薬組成物。



1

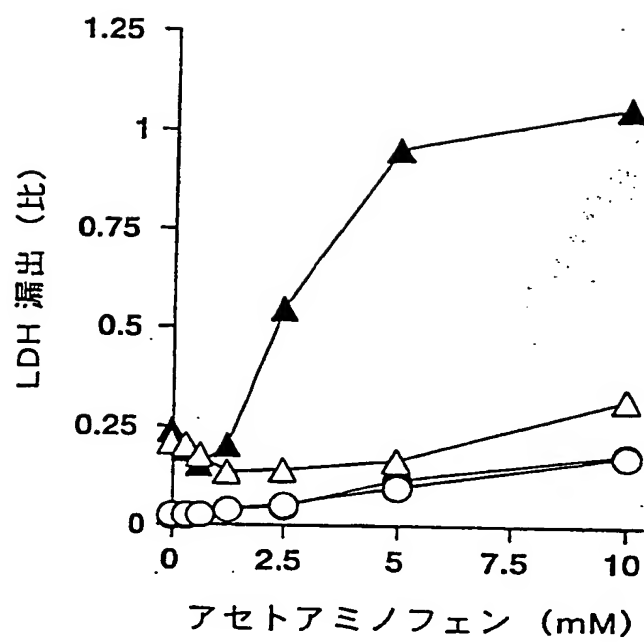


THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/7



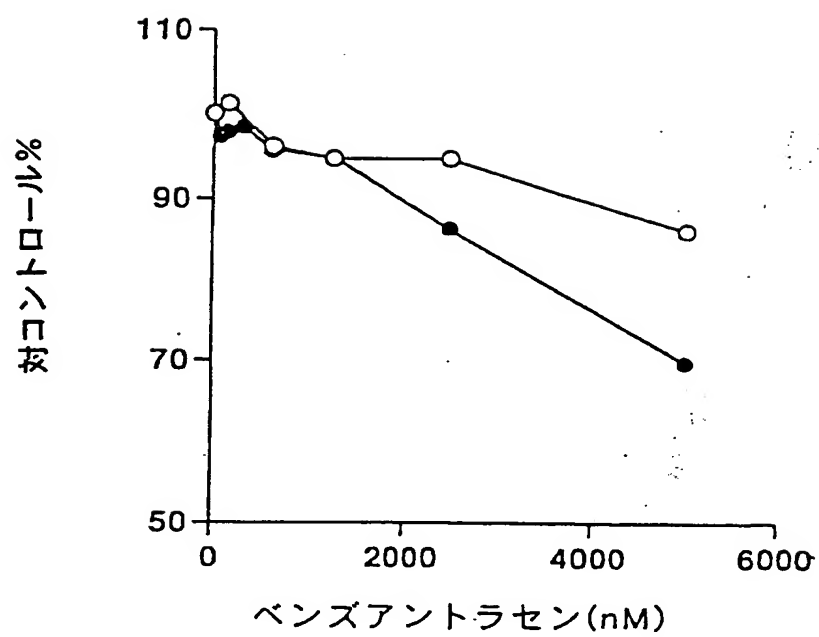
2



THIS PAGE BLANK (USPTO)



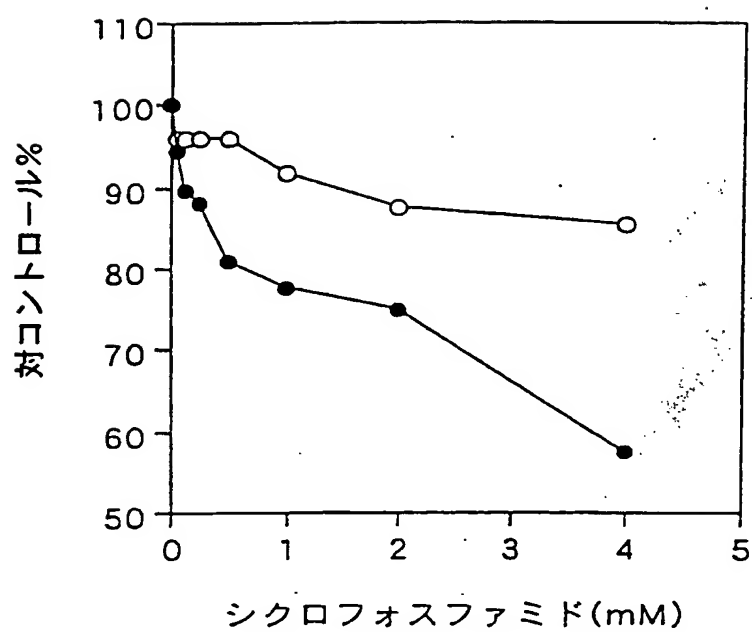
3



THIS PAGE BLANK (USPTO)



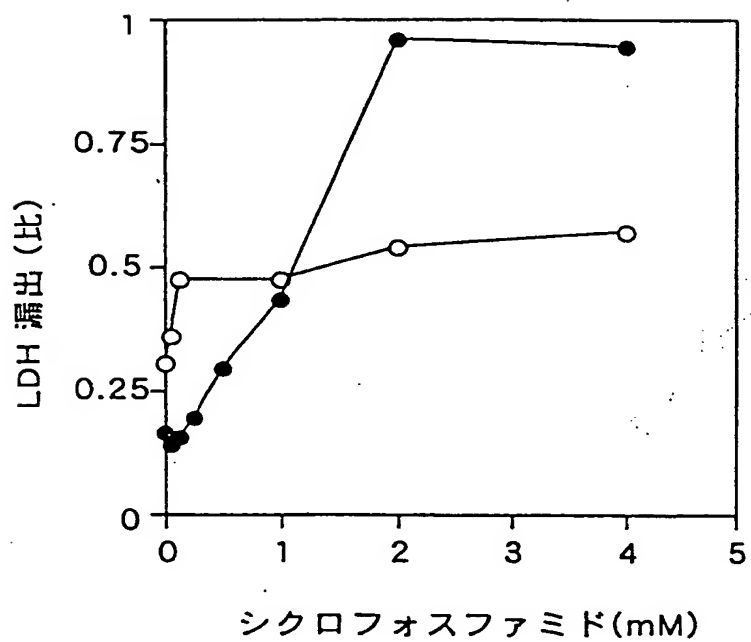
4



THIS PAGE BLANK (USPTO)



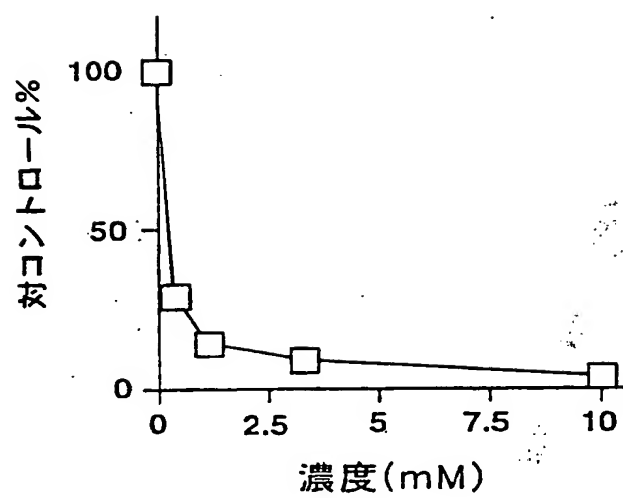
5



THIS PAGE BLANK (USPTO)



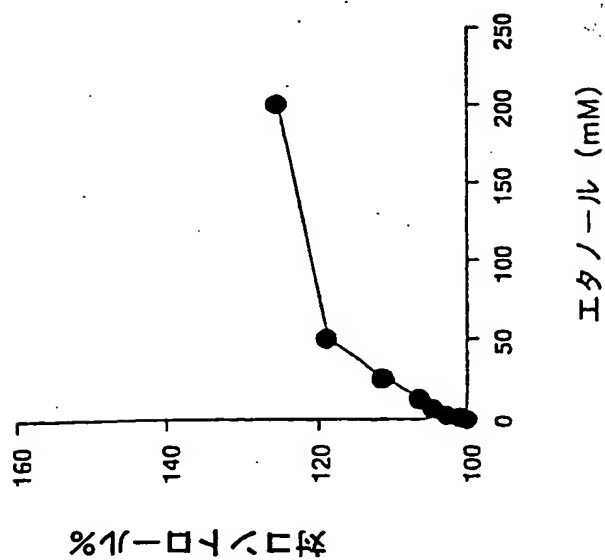
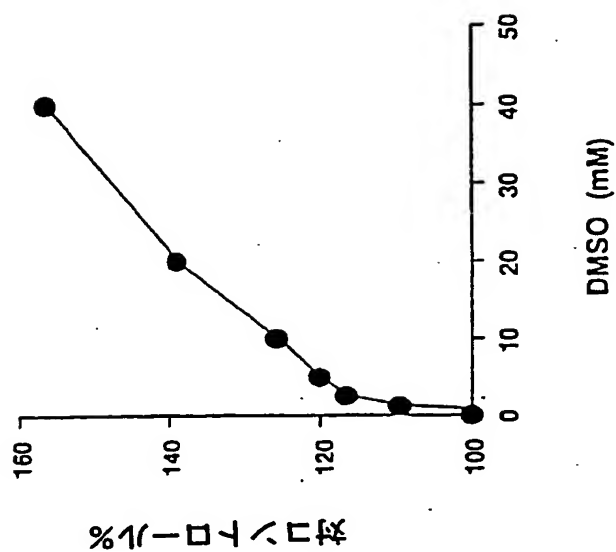
6



THIS PAGE BLANK (USPTO)



7



THIS PAGE BLANK (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS (1995), Vol.273, No.3, pp.1497-1505 | 1-14 2,4,10-14 |
| X Y | Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1996), Vol.271, No.39, pp.23914-23919 | 1-14 2,4,10-14 |
| Y | G.SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", XENOBIOTICA (1998), Vol.28, No.12, pp.1129-1165 | 2,4,10-14 |
| Y | Els M.de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450-expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", CANCER RESEARCH (1996), Vol.56, No.2, pp.299-304 | 2,4,10-14 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not

considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing

date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 August, 2000 (04.08.00)

Date of mailing of the international search report

15 August, 2000 (15.08.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (10)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------|
| X/Y | YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS (1995), Vol. 273, No. 3, p. 1497-1505 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |
| X/Y | Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1996), Vol. 271, No. 39, p. 23914-23919 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", XENOBIOTICA (1998), Vol. 28, No. 12, p. 1129-1165 | 2, 4, 10-14 |
| Y | Els M. de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450 -expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", CANCER RESEARCH (1996), Vol. 56, No. 2, p. 299-304 | 2, 4, 10-14 |

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 2597WOOP | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP00/02763 | 国際出願日 (日.月.年) 27.04.00 | 優先日 (日.月.年) 27.04.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|----------------------|
| X/Y | YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS (1995), Vol. 273, No. 3, p. 1497-1505 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |
| X/Y | Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1996), Vol. 271, No. 39, p. 23914-23919 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", XENOBIOTICA(1998), Vol. 28, No. 12, p. 1129-1165 | 2, 4, 10-14 |
| Y | Els M. de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450-expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", CANCER RESEARCH(1996), Vol. 56, No. 2, p. 299-304 | 2, 4, 10-14 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。



国際予備審査機関記入欄

| | | | |
|--|-----------------------------|---------------------------------------|--|
| 国際予備審査機関の確認 | | 請求書の受理の日 | |
| 第 I 欄 国際出願の表示 | | 出願人又は代理人の書類記号 2597WO0P | |
| 国際出願番号 PCT/JP00/02763 | 国際出願日 (日. 月. 年) 27.04.00 | 優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 27.04.99 | |
| 発明の名称 チトクロームP450を安定に発現するヒト細胞株 | | | |
| 第 II 欄 出願人 | | | |
| 氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載) 武田薬品工業株式会社 TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, OSAKA 541-0045 JAPAN | | 電話番号: ファクシミリ番号: 加入電話番号: | |
| 国籍 (国名): 日本国 Japan | | 住所 (国名): 日本国 Japan | |
| 氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載) 難波正義 NANBA Masayoshi 〒700-0001 日本国岡山県岡山市宿400-1 400-1, Syuku, Okayama-shi, OKAYAMA 700-0001 JAPAN | | | |
| 国籍 (国名): 日本国 Japan | | 住所 (国名): 日本国 Japan | |
| 氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載) 朝日知 ASAHI Satoru 〒565-0085 日本国大阪府豊中市上新田1丁目24番A-307号 24-A-307, Kamishinden 1-chome, Toyonaka-shi, OSAKA 565-0085 JAPAN | | | |
| 国籍 (国名): 日本国 Japan | | 住所 (国名): 日本国 Japan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。 | | | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅱ欄の続き 出願人

この第Ⅱ欄の続きを使用しない時は、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

吉富純枝 YOSHITOMI Sumie

〒535-0001 日本国大阪府大阪市旭区太子橋1丁目27番4号

27-4, Taishibashi 1-chome, Asahi-ku, Osaka-shi, OSAKA

535-0001 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

池本慶子 IKEMOTO Keiko

〒665-0815 日本国兵庫県宝塚市山本丸橋2丁目11番地の5

11-5, Yamamotomaruhashi 2-chome, Takarazuka-shi, HYOGO

665-0815 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として☒ 既に選任された者であつて、国際予備審査についても出願人を代理する者である。☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

電話番号:

11404 弁理士 高橋 秀一 TAKAHASHI Shuichi

03-3278-2235

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

ファクシミリ番号:

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

03-3278-2222

c/o Osaka Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd.

加入電信番号:

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA

532-0024 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: *

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。☐ 明細書に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。☐ 請求の範囲に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正(添付した説明書も含む)を基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。☐ 図面に関して☐ 出願時のものを基礎とすること。☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。2 ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。3 ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを望む (ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く (規則69.1(d))。 (この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。))

* 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正(原本又は写し)を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正(原本又は写し)を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日 本 語 であり、

☒ 国際出願提出時の言語である。☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。☐ 国際出願の公開の言語である。☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国(即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国)を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

1. 国際出願の翻訳文 枚
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 枚
3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し 枚
4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文) の写し 枚
5. 書簡 枚
6. その他(書類名を具体的に記載する): 枚

受領

未受領

☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
- ☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☒ 国際事務局の口座への振込を証明する書面
2. ☐ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印(署名)に関する説明書
5. ☐ スクレオチド又はアミノ酸配列表
(フレキシブルディスク)
6. ☐ その他(書類名を具体的に記載する):

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名(名称)記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

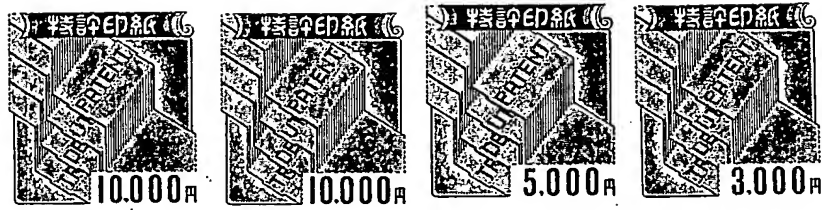
P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国際予備審査請求書の附属書

| 国際出願番号 | | 国際予備審査機関記入欄 | |
|--|----------|--------------|--|
| PCT/JP00/02763 | | | |
| 出願人又は代理人の書類記号 | | 国際予備審査機関の日付印 | |
| 2597WO0P | | | |
| 出願人 武田薬品工業株式会社 | | | |
| 所定の手数料の計算 | | | |
| 1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法) 第18条第1項第4号の規定による手数料 (予備審査請求料) (注1) | 28,000 円 | P | |
| 2. 取扱手数料 (注2)..... | 14,600 円 | H | |
| 3. 所定の手数料の合計 | 42,600 円 | | |
| P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入... | 合 計 | | |
| (注1) 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。 | | | |
| (注2) 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の 口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。 | | | |

THIS PAGE BLANK (USPTC)



予備審査請求料

28,000円

THIS PAGE BLANK (USPTO)

振込みを証明する書面

| | | | | | |
|--|--|------------------------|--|---|--|
| 振込金受取書 (兼振込手数料受取書) | | 振込方法 住友本支店宛 | | 他行宛 電信 | |
| お手続き日 12年 9月 8日 | | 振込金額 444,417 | | 振込種目 9 1.普通 4.貯蓄 2.当座 9.その他 非居住者円普通預金 | |
| お振込先 東京三菱銀行 内幸町支店 | | 口座番号 0473286 | | おつめでご記入ください。 | |
| お振込人 フリガナ ワイポーピーシーティー、ジュネーブ WIPU-PCT, Geneya様 | | 金額 百 千 万 円 千 百 十 円 角 分 | | 444,417.00 | |
| お振込人 フリガナ タケダヤクヒンコウギョウカブシキガイシャ 武田薬品工業株式会社 様 東京都中央区日本橋二丁目12番10号 (ご連絡先お電話) 03-2228-2226 | | 内 振 込 金 他 振 込 金 | | (本支店の現金のみ記入する) | |

- 振込依頼時に記載欄等の不備があった場合には、振込等のために振込金が滞ることがあります。
- 振込依頼、振込の滞りまたは振込物の返送等やむを得ない事由によって振込みが滞延することもありますのでご了承ください。

振込手数料 株式会社 住友銀行

このたびは住友銀行をご利用いただきまして、誠にありがとうございました。
今後とも引き続きお引き立て賜りますよう、お願い申し上げます。
お振込みは早くて便利な自動サービス機をご利用ください。
現金でのお振込みは、平日 午後6時までお取り扱いいたします。
キャッシュカードでのお振込みは、平日6時以降、土・日曜日、祝日もお取り扱いいたします。(一部店舗を除く)



取扱手数料

14,600円

THIS PAGE BLANK (USPTO)

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T

国際予備審査請求書
の受理通知書

2000.9.28

知的財産部

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

PCT/JP00/02763

PE402

発送日（日．月．年）

26.09.00

出願人又は代理人
の書類記号

2597WO0P

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/02763

国際出願日（日．月．年）

27.04.00

優先日（日．月．年）

27.04.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

14 日 09 月 00 年

2. この受理の日は次に示す日である。

☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）

☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）

☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | | | |
|-----|-----|-------|-----|
| 担当者 | G・M | Pat・M | 部長 |
| 特許 | 長 | | |
| 特許 | 協 | 力 | 条 約 |

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

00.10.15

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
[PCT規則44.1]

発送日
(日.月.年)

15.08.00

受付

00.8.16

知的財産部

出願人又は代理人
の書類記号

2597WOOP

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JPO0/02763

国際出願日
(日.月.年)

27.04.00

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/ISA/220 (1998年7月)

(添付用紙を参照)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。
国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。
明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。
国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。
差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。
差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。
補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 2597WOOP | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP00/02763 | 国際出願日 (日.月.年) 27.04.00 | 優先日 (日.月.年) 27.04.99 |
| 出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------|
| X/Y | YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS (1995), Vol. 273, No. 3, p. 1497-1505 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |
| X/Y | Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1996), Vol. 271, No. 39, p. 23914-23919 | 1-14/ 2, 4, 10-14 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (uspto)

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", XENOBIOTICA(1998), Vol. 28, No. 12, p. 1129-1165 | 2, 4, 10-14 |
| Y | Els M. de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450 -expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", CANCER RESEARCH(1996), Vol. 56, No. 2, p. 299-304 | 2, 4, 10-14 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)



発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三木町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
(PCT規則71.1)



発送日

(日.月.年)

30 01 01

出願人又は代理人
の登録記号

2597WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/02763

国際出願日

(日.月.年) 27.04.00

優先日

(日.月.年) 27.04.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

| | | | |
|---|---------------------------|---|--|
| 出願人又は代理人 の書類記号 | 2597WOOP | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/02763 | 国際出願日 (日.月.年) 27.04.00 | 優先日 (日.月.年) 27.04.99 | |
| 国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16 | | | |
| 出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社 | | | |

| |
|--|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。 |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。 |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

| | |
|---|---|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 14.09.00 | 国際予備審査報告を作成した日 17.01.01 |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|----------------|-------|---------------|---|
| 新規性 (N) | 請求の範囲 | 4, 6-9, 11-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-3, 5, 10 | 無 |
| 進歩性 (IS) | 請求の範囲 | | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-14 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol.271, No.39, (1996), Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", p.23914-23919
- 文献2: THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, Vol.273, No.3, (1995), YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", p.1497-14505
- 文献3: XENOBIOTICA, Vol.28, No.12, (1998), G.SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", p.1129-1165
- 文献4: CANCER RESEARCH, Vol.56, No.2, (1996), Els M.de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450-expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", p.299-304

請求の範囲 1-3, 5, 10

請求の範囲 1-3, 5, 10 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から新規性を有しない。

文献1及び2には、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析するのに非常に有用な細胞株としてヒトチトクロームP4502E1を安定に発現するHepG2細胞株が記載されており、該細胞株を用いてそれぞれアセトアミノフェン及びエタノールの細胞毒性のメカニズムを解析する方法も記載されているから、請求の範囲 1-3, 5, 10 に記載された発明は、文献1及び2に記載された発明と実質的に区別できない。

請求の範囲 6-9

請求の範囲 6-9 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から進歩性を有しない。

薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株をもちいて、代謝産物を調製したり、生理活性に影響を及ぼす新規物質を探索し、得られた該物質を医薬として用いようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 2, 4, 10-14

請求の範囲 2, 4, 10-14 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1-4 から進歩性を有しない。

文献 3 には、ヒトチトクローム P450 の 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 遺伝子について記載されている。また、文献 4 に記載されるように、様々なヒトチトクローム P450 遺伝子 (1A1, 1A2, 2D6, 2E1) を安定的に発現する細胞株として、3T3 細胞株が公知となっている。してみると、様々なヒトチトクローム P450 を安定に発現し、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株を得ようとして、文献 1 及び 2 に記載された発明において、ヒトチトクローム P450 2E1 のほかに、文献 3 に記載された様々なヒトチトクローム P450 1A1, 1A2 等の遺伝子を安定に発現する HepG2 細胞株を得ようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。また、ヒトチトクローム P450 を安定に発現する HepG2 細胞株のうち、より好ましいものを選択することも当業者が容易になし得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference 2597WO0P | FOR FURTHER ACTION | | See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |
| International application No. PCT/JP00/02763 | International filing date (day/month/year) 27/04/2000 | Priority date (day/month/year) 27/04/1999 | |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int.C1⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/18 | | | |
| Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD | | | |

| | |
|--|---|
| 1. | This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. |
| 2. | This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet. |
| <input type="checkbox"/> | This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions under the PCT). |
| These annexes consist of a total of sheets. | |

| | |
|------|---|
| 3. | This report contains indications relating to the following items: |
| I | <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report |
| II | <input type="checkbox"/> Priority |
| III | <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| IV | <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention |
| V | <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| VI | <input type="checkbox"/> Certain documents cited |
| VII | <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application |
| VIII | <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application |

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 14/09/2000 | Date of completion of this report 17/01/2001 |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigasaki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN | Authorized officer KITAMURA Hiroki Telephone No. 03 3581 1101 3448 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP00/02763

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)).

☒ International Filing Document as originally filed

Description, pages:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Claims, No:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Drawings No:

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Sequence Listing

- ☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: . which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP00/02763

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|------|--------|-----------------------------|
| Novelty (N) | Yes: | Claims | <u>4,6-9,11-14</u> |
| | No: | Claim | <u>1-3, 5, 10</u> |
| Inventive Step (IS) | Yes: | Claims | <u> </u> |
| | No: | Claims | <u>1-14</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: | Claims | <u>1-14</u> |
| | No: | Claims | <u> </u> |

2. Citations and explanations

- Document1 : THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 271, No. 39, (1996),
Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human
Cytochrome P4502E1", p.23914-23919
- Document2 : THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, Vol. 273, No. 3, (1995),
YAN DAI et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2
Cells", p.1497-14505
- Document3 : XENOBIOTICA, Vol. 28, No.12, (1998), G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome
P450 monooxygenase superfamily", p.1129-1165
- Document4 : CANCER RESEARCH, Vol. 56, No. 2, (1996), Els M de Groene, et al., "Development of Human
Cytochrome P450-expressing Cell Lines:
Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", p. 299-304

Claims 1 to 3, 5 and 10

The invention described in Claims 1 to 3, 5 and 10 is not novel according to the References 1 and 2 cited in the International Search Report.

Since, in the References 1 and 2, HepG2 cell line that stably expresses human cytochrome P450 2E1 has been described as a useful cell line for analysis of metabolism and cytotoxicity of drugs, and the analytical method for mechanism of cytotoxicity by acetaminofene and ethanol using the cell line is also described, the invention described in Claims 1 to 3, 5 and 10 is not essentially distinguishable from the invention described in the References 1 and 2.

Claims 6 to 9

The invention described in Claims 6 to 9 has no inventive step according to the References 1 and 2 cited in the International Search Report.

It is easily arrived by persons skilled in the art at preparation of metabolites and screening for novel substances that affect physiological activity using the cell line capable of analyzing metabolism and cytotoxicity of drugs, and use of the obtained substances as pharmaceutical compositions.

THIS PAGE BLANK (USP)

INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP00/02783

Re Item V

Claims 2, 4 and 10 to 14

The invention described in Claims 2, 4 and 10 to 14 has no inventive step according to the References 1 to 4 cited in the International Search Report.

The Reference 3 describes as to human cytochrome P450 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 and 3A4 genes. As described in the Reference 4, 3T3 cell line is publicly known as a cell line that stably expresses various human cytochrome P450 genes (1A1, 1A2, 2D6 and 2E1). Thus, it is easily arrived by persons skilled in the art at obtaining HepG2 cell line that stably expresses various human cytochrome P450 1A1, 1A2 and others' genes described in the Reference 3 other than human cytochrome P450 2E1 in the invention described in the References 1 and 2 for the sake of acquisition of cell lines that stably express various human cytochrome P450 and are capable of analyzing metabolism and cytotoxicity of drugs. It is also easily arrived by persons skilled in the art at selecting preferable cell line from the HepG2 cell line that stably expresses human cytochrome P450.

PCT/IPEA/409

THIS PAGE BLANK (USP 712)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/02763

18

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

| | | | |
|---|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 21 November 2000 (21.11.00) | | To: | |
| Applicant's or agent's file reference 2597WO0P | | IMPORTANT INFORMATION | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) | |
| Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al | | | |

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AG, AU, BG, CA, CN, CZ, DZ, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BR, BY, CR, CU, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, KG, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MX, SG, SI, TJ, TM, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer: Diana Nissen |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

受付

00.11.14

知的財産部

| | | | |
|---|--|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 02 November 2000 (02.11.00) | | IMPORTANT NOTICE | |
| Applicant's or agent's file reference 2597WO0P | | | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) | |
| Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al | | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,
JP,KG,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,TJ,TM,TR,TT,
UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
02 November 2000 (02.11.00) under No. WO 00/65031

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

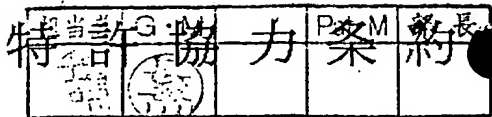
If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|---|---------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/19 東京Fax済



235回(2001.5月17日)
47番紙。

発信人 日本国特許庁 (受理官庁)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

(法施行規則第22条、第23条) 00.5.17
〔PCT規則20.5(c)〕

受付

知的財産部

PCT/JP00/02763

RO105

発送日 (日. 月. 年)

16. 05. 00

出願人又は代理人
の書類記号

2597WO0P

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/02763

国際出願日 (日. 月. 年)

27. 04. 00

優先日 (日. 月. 年)

27. 04. 99

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、16日05月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード (日本の場合JP)、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名 (名称) に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知 (様式PCT/IB/301) する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁 (RO/JP)

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105 (1998年7月)

権限のある職員

特 許 庁 長 官

THIS PAGE BLANK (USPTO)

| | | | |
|---------------------------|-----|-------|----|
| 担当者 | G・M | Pat・M | 部長 |
| PATENT COOPERATION TREATY | | | |

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 05 June 2000 (05.06.00) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference 2597WOOP | International application No. PCT/JP00/02763 |

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
NANBA, Masayoshi (all designated States)
ASAHI, Satoru et al (for US)

International filing date : 27 April 2000 (27.04.00)
Priority date(s) claimed : 27 April 1999 (27.04.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 19 May 2000 (19.05.00)
List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AG,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CN,CR,CU,CZ,DM,DZ,EE,GD,GE,HR,HU,ID,
IL,IN,IS,JP,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,PL,RO,RU,SG,SI,SK,TJ,
TM,TR,TT,UA,US,UZ,VN,YU,ZA



ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des C. lombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: Y. KUWAHARA Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference 2597WO0P | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) |
| Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al | |

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 27 April 1999 (27.04.99) | 11/120747 | JP | 26 June 2000 (26.06.00) |

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Tessadel PAMPLIEGA *Tdp*

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

| | |
|---------|---------|
| 受理官庁記入欄 | |
| 国際出願番号 | |
| 国際出願日 | 27.4.00 |
| (受付印) | 受領印 |

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2597WO0P

第 I 欄 発明の名称

チトクローム P 4 5 0 を安定に発現するヒト細胞株

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

難波正義 NANBA Masayoshi
〒700-0001 日本国岡山県岡山市宿 4 0 0 - 1
400-1, Syuku, Okayama-shi, OKAYAMA 700-0001 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である: ☒ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する: ☒ 代理人 ☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

THIS PAGE BLANK

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

朝日知 ASAHI Satoru
〒565-0085 日本国大阪府豊中市上新田1丁目24番A-307号
24-A-307, Kamishinden 1-chome, Toyonaka-shi, OSAKA
565-0085 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

吉富純枝 YOSHITOMI Sumie
(〒535-0001 日本国大阪府大阪市旭区太子橋1丁目27番4号
27-4, Taishibashi 1-chome, Asahi-ku, Osaka-shi, OSAKA
535-0001 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

池本慶子 IKEMOTO Keiko
(〒665-0815 日本国兵庫県宝塚市山本丸橋2丁目11番地の5
11-5, Yamamotomaruhashi 2-chome, Takarazuka-shi, HYOGO
665-0815 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域特許

- ☒ **AP** **ARIPO特許**：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, TZ タンザニア United Republic of Tanzania, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア特許**：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ特許**：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI特許**：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサオ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MA モロッコ Morocco |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR コスタリカ Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> DM ドミニカ Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダッド・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> TZ タンザニア United Republic of Tanzania |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- ☒ **DZ** アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria
- ☒ **AG** アンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda
- ☐
- ☐

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15ヶ月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認（料金を含む）は、優先日から15ヶ月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

THIS PAGE BLANK (USP 16)

追記欄

この追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄.....の続き」(欄番号を表示する) と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅶ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅶ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

THIS PAGE BLANK (USE TO)

| 第VI欄 優先権主張 | | 他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載される | | |
|--------------------|----------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| 先の出願日 (日. 月. 年) | 先の出願番号 | 先 の 出 願 | | |
| | | 国内出願 : 国 名 | 広域出願 : *広域官庁名 | 国際出願 : 受理官庁名 |
| (1) 27. 04. 99 | 平成11年特許願 第120747号 | 日本国 Japan | | |
| (2) | | | | |
| (3) | | | | |

☒ 上記 () の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限り)のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本特許庁の長官)に対して請求している。 (1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

| 国際調査機関 (ISA) の選択 | 先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会 (先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合) |
|------------------|---|
| (ISA/JP | 出願日 (日. 月. 年) 出願番号 国名 (又は広域官庁) |

第VIII欄 照合欄; 出願の言語

| | |
|-----------------------------|---|
| この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。 | この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。 |
| 願書 5 枚 | 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 |
| 明細書 (配列表を除く) 42 枚 | <input type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 |
| 請求の範囲 3 枚 | <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 |
| 要約書 1 枚 | 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 |
| 図面 7 枚 | 3. <input checked="" type="checkbox"/> 包括委任状の写し |
| 明細書の配列表 0 枚 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書 |
| 合計 58 枚 | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第VI欄の () の番号を記載する): |
| | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する): |
| | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 |
| | 8. <input type="checkbox"/> スクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク) |
| | 9. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する): |

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名:

日本語

IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



| 受理官庁記入欄 | |
|--|---|
| 1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日 | 2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある |
| 3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつて その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日) | |
| 4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日 | |
| 5. 出願人により特定された 国際調査機関 ISA/JP | |
| 6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない | |

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月:再版2000年1月)

THIS PAGE BLANK (copy)

P C T

手数料計算用紙
願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

2597WO0P

受理官庁の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
（送付手数料 [T] 及び調査手数料 [S] の合計）

95,000 円 T+S

国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 58 枚

最初の30枚まで

46,000 円 b1

28 × 1,100 =

30,800 円 b2

30枚を越える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

76,800 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 64

8 × 9,900 =

79,200 円 D

支払うべき指定手数料
の数（上限は8）
（注4）

1指定当たり
の手数料
（円）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

156,000 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

251,000 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込を証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した □ の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、8指定以上は一律8とする。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference 2597WO0P | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP00/02763 | International filing date (day/month/year) 27 April 2000 (27.04.00) | Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/10, C12Q 1/02, A61K 45/00, A61P 1/16 | | |
| Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 14 September 2000 (14.09.00) | Date of completion of this report 17 January 2001 (17.01.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02763

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USP 10)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02763

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|-------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 4,6-9,11-14 | YES |
| | Claims | 1-3,5,10 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-14 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-14 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1: Defung Wu, et al., "Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P450 2E1," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 39, 1996, p. 23914-23919

Document 2: Yan Dai, et al., "Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450 2E1-transfected HepG2 cells," The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 273, No. 3, 1995, p. 14497-14505

Document 3: G. Smith, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily," Xenobiotica, Vol. 28, No. 12, 1998, p. 1129-1165

Document 4: Els M. de Groene, et al., "Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: Application in mutagenicity testing of ochratoxin A," Cancer Research, Vol. 56, No. 2, 1996, p. 299-304

Claims 1-3, 5 and 10

Based on the descriptions in documents 1 and 2 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 1-3, 5 and 10 do not appear to be novel.

Documents 1 and 2 describe HepG2 cell lines that stably express cytochrome P450 as cell lines that are extremely useful in elucidating drug metabolism and drug cytotoxicity, and they describe methods for elucidating the mechanism of acetaminophen and ethanol cytotoxicity, respectively. Therefore, the inventions set forth in Claims 1-3, 5 and 10 are essentially indistinguishable from the inventions described in documents 1 and 2.

Claims 6-9

Based on the descriptions in documents 1 and 2 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 6-9 do not appear to involve an inventive step.

Persons skilled in the art can easily utilize a cell line that can elucidate drug metabolism and drug cytotoxicity, prepare metabolites, search for novel substances that have an effect on

THIS PAGE BLANK (copy)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02763

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of Box V (Citations and explanations):

physiological activity, and utilize the substances thus obtained as drugs.

Claims 2, 4, and 10-14

Based on the descriptions in documents 1-4 cited in the international search report, the inventions set forth in Claims 2, 4 and 10-14 do not appear to involve an inventive step.

Document 3 describes the 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, and 3A4 genes of human cytochrome P450. Furthermore as described in document 4, the 3T3 cell line is widely known as a cell line that stably expresses various human cytochrome P450 genes (1A1, 1A2, 2D6, 2E1). As a result, this examination finds that persons skilled in the art can easily attempt to use the HepG2 cell lines described in document 3 that stably express various human cytochrome P450 genes such as 1A1, 1A2, and the like, in addition to human cytochrome P450 E1, as a cell line that stably expresses various forms of human cytochrome P450 and can be used to elucidate drug metabolism and drug cytotoxicity in the inventions described in documents 1 and 2. Furthermore, persons skilled in the art can select preferable cell lines from among the HepG2 cell lines that stably express human cytochrome P450.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 05 FEB 2001

WIPO

PCT

| | | |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 2597WOOP | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/02763 | 国際出願日 (日.月.年) 27.04.00 | 優先日 (日.月.年) 27.04.99 |
| 国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16 | | |
| 出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社 | | |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 14.09.00 | 国際予備審査報告を作成した日 17.01.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 北村 弘樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4B 2936 |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (GPO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|----------------|-------|---------------|---|
| 新規性 (N) | 請求の範囲 | 4, 6-9, 11-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-3, 5, 10 | 無 |
| 進歩性 (IS) | 請求の範囲 | | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-14 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 271, No. 39, (1996), Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1", p. 23914-23919
- 文献2: THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, Vol. 273, No. 3, (1995), YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells", p. 1497-14505
- 文献3: XENOBIOTICA, Vol. 28, No. 12, (1998), G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", p. 1129-1165
- 文献4: CANCER RESEARCH, Vol. 56, No. 2, (1996), Els M. de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450-expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", p. 299-304

請求の範囲 1-3, 5, 10

請求の範囲 1-3, 5, 10 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から新規性を有しない。

文献1及び2には、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析するのに非常に有用な細胞株としてヒトチトクロームP4502E1を安定に発現するHepG2細胞株が記載されており、該細胞株を用いてそれぞれアセトアミノフェン及びエタノールの細胞毒性のメカニズムを解析する方法も記載されているから、請求の範囲1-3, 5, 10に記載された発明は、文献1及び2に記載された発明と実質的に区別できない。

請求の範囲 6-9

請求の範囲 6-9 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から進歩性を有しない。

薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株をもちいて、代謝産物を調製したり、生理活性に影響を及ぼす新規物質を探索し、得られた該物質を医薬として用いようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 2, 4, 10-14

請求の範囲 2, 4, 10-14 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1-4 から進歩性を有しない。

文献 3 には、ヒトチトクローム P450 の 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 遺伝子について記載されている。また、文献 4 に記載されるように、様々なヒトチトクローム P450 遺伝子 (1A1, 1A2, 2D6, 2E1) を安定的に発現する細胞株として、3T3 細胞株が公知となっている。してみると、様々なヒトチトクローム P450 を安定に発現し、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株を得ようとして、文献 1 及び 2 に記載された発明において、ヒトチトクローム P450 2E1 のほかに、文献 3 に記載された様々なヒトチトクローム P450 1A1, 1A2 等の遺伝子を安定に発現する HepG2 細胞株を得ようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。また、ヒトチトクローム P450 を安定に発現する HepG2 細胞株のうち、より好ましいものを選択することも当業者が容易になし得ることである。

THIS PAGE BLANK (0370)

| | | | |
|----------|----------|-------|----|
| 担当者 | G・M | Pat・M | 部長 |
| 10/10/10 | 10/10/10 | | |

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

PCT見解書

00.12.17

(法第13条)
[PCT規則66]

受付

00.10.19

知的財産部

発送日
(日.月.年)

17.10.00

出願人又は代理人
の書類記号

2597WO0P

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/02763

国際出願日

(日.月.年) 27.04.00

優先日

(日.月.年) 27.04.99

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl⁷ C12N5/10, C12Q1/02, A61K45/00, A61P1/16

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
 - ☒ 見解の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に回答することが求められる。
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 27.08.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
引地 進

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条(PCT規則66.2(a)(ii))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|---------------|-------|---------------|---|
| 新規性(N) | 請求の範囲 | 4, 6-9, 11-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-3, 5, 10 | 無 |
| 進歩性(IS) | 請求の範囲 | | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-14 | 無 |
| 産業上の利用可能性(IA) | 請求の範囲 | 1-14 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明

文献1: Defeng Wu, et al., "Ethanol Cytotoxicity to a Transfected HepG2 Cell Line Expressing Human Cytochrome P4502E1",
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY(1996), Vol. 271, No. 39,
p. 23914-23919

文献2: YAN DAI, et al., "Cytotoxicity of Acetaminophen in Human Cytochrome P4502E1-Transfected HepG2 Cells",
THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS(1995),
Vol. 273, No. 3, p. 1497-14505

文献3: G. SMITH, et al., "Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily", XENOBIOTICA(1998), Vol. 28, No. 12,
p. 1129-1165

文献4: ~~Els M. de Groene, et al., "Development of Human Cytochrome P450-expressing Cell Lines: Application in Mutagenicity Testing of Ochratoxin A", CANCER RESEARCH(1996), Vol. 56, No. 2, p. 299-304~~

請求の範囲 1-3, 5, 10

請求の範囲 1-3, 5, 10 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から新規性を有しない。

文献1及び2には、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析するのに非常に有用な細胞株としてヒトチトクロームP4502E1を安定に発現するHepG2細胞株が記載されており、該細胞株を用いてそれぞれアセトアミノフェン及びエタノールの細胞毒性のメカニズムを解析する方法も記載されているから、請求の範囲 1-3, 5, 10 に記載された発明は、文献1及び2に記載された発明と実質的に区別できない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 V 欄の続き

請求の範囲 6－9

請求の範囲 6－9 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1 及び 2 から進歩性を有しない。

薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株をもちいて、代謝産物を調製したり、生理活性に影響を及ぼす新規物質を探索し、得られた該物質を医薬として用いようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。

請求の範囲 2, 4, 10－14

請求の範囲 2, 4, 10－14 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1－4 から進歩性を有しない。

文献 3 には、ヒトチトクローム P450 の 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 遺伝子について記載されている。また、文献 4 に記載されるように、様々なヒトチトクローム P450 遺伝子（1A1, 1A2, 2D6, 2E1）を安定的に発現する細胞株として、3T3 細胞株が公知となっている。してみると、様々なヒトチトクローム P450 を安定に発現し、薬物代謝や薬物の細胞毒性を解析することができる細胞株を得ようとして、文献 1 及び 2 に記載された発明において、ヒトチトクローム P450 2E1 のほかに、文献 3 に記載された様々なヒトチトクローム P450 1A1, 1A2 等の遺伝子を安定に発現する HepG2 細胞株を得ようとすることは当業者が容易に想到し得ることである。また、ヒトチトクローム P450 を安定に発現する HepG2 細胞株のうち、より好ましいものを選択することも当業者が容易になし得ることである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

注 意

提出書類の様式及び作成要領について

答弁書及び手続補正書は、特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律施行規則第62条（様式第23）及び同規則第31条（様式15）に従って作成して下さい。

〔備考〕

- 用紙は、日本工業規格A4（横21cm、縦29.7cm）の大きさとし、可燃性のある、丈夫な、白色の、滑らかな、光沢のない、耐久性のあるものを縦長にして、折らずに片面のみを用い、用紙には、不要な文字、記号、枠線、けい線等を記載してはならない。
- 用紙は、しわ及び折り目があってはならない。
- 余白は、少なくとも用紙の上端、右端及び下端におおの2cm並びに左端に2.5cmをとるものとし、原則としてその上端及び左端についてはおのおの4cm並びにその右端及び下端についてはおのおの3cmを越えないものとする。この場合において、余白は、完全な空白としておくこととする。ただし、上端の余白の左端であって上端から1.5cm以内に番付番号（願書に記載されている場合に限り。）を付すことができる。
- 答弁書は、タイプ印字又は印刷によるものとし、写真、静電的方法、写真オフセット及びマイクロフィルムによって直接に任意の部数複製をすることができるとして作成する。
- 答弁書の用紙は、アラビア数字により1から始まる連続番号を用紙（余白部分を除く。）の上端又は下端の中央に付す。
- タイプ印字による場合において、行の間隔は、少なくとも5mm以上をとる。ただし、備考11、14においてローマ字を用いるときは、1.5文字の幅をとる。
- 記載事項は、4号活字の大きさの文字（備考11、14においてローマ字を用いるときは、大文字の大きさが縦0.21cm以上の文字）により、かつ、暗色の退色性のない色であって備考4に定める要件を満たすもので記載する。
- 「国際出願の表示」の欄には、既に特許庁から国際出願番号の通知を受けている場合には、その番号を「PCT/P/○○/○○○○」のように記載し、国際出願番号の通知を受ける前の場合には、その国際出願の提出日を月年日の順に「○○.○○.○○」の国際出願（年）については西暦紀元の下2桁）のように記載するとともに、番付番号（願書に記載されている場合に限り。）を合わせて記載する。
- 「氏名（名称）」は、自然人にあっては姓及び名を姓、名の順に記載し、また、法人にあってはその名称を記載する。
- 「あて名」は、「日本国、何県、何郡、何村、大字何、字何、何番地、何号」のように詳しく記載するとともに、郵便番号を記載する。
- 氏名若しくは名称又はあて名には、これらの音訳又は英語への訳訳をローマ字を用いて併記する。
- 「国籍」は、出願人又は代表者がその国民である国の国名を記載する。
- 「住所」は、出願人又は代表者がその居住者である国の国名を記載する。
- 国名を記載する場合においては、特許庁長官が指定する国の名称を日本語及び英語により表示する。
- 「代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」、「弁理士」又は「法定代理人」のうち該当するものを記載する。
- 代理人によるときは本人の印は不要とし、代理人によらないときは「代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 各用紙においては、原則として捺印、訂正、重ね書き及び行間挿入を行うてはならない。
- 答弁書の用紙は、容易に分離し、又はとじ直すことができるように例えばクリップ等を用いてとじる。
- 「あて名」は出願人、代表者、代理人又は復代理人各人ごとに1つのあて名のみを記載する。
- 「復代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」又は「弁理士」のうち該当するものを記載する。
- 復代理人によるときは代理人の印は不要とし、復代理人によらないときは「復代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 日付は、西暦紀元及びグレゴリー暦により、日についての数字、月についての数字及び年についての最後から2つの数字をこの順序に従ってそれぞれについて2桁のアラビア数字で表示し、かつ、日及び月の数字の後にピリオドを付す（例えば1978年3月30日は「30.03.78」）。他の紀元又は暦を用いる場合には、西暦紀元及びグレゴリー暦による日付を併記する。

様式第23（第62条関係）

| 答 弁 書 | |
|------------|---------------------------|
| 特許庁審査官 | 殿 |
| 1 国際出願の表示 | |
| 2 出願人（代表者） | 氏名（名称） あて名 国籍 住所 |
| 3 代理人 | 氏名 あて名 |
| 4 通知の日付 | |
| 5 答弁の内容 | |
| 6 添付書類の目録 | |

〔備考〕

- 法第6条の規定による命令に基づき補正をするときは類型を「手続補正書（法第6条の規定による命令に基づく補正）」とし、法第11条の規定による補正をするときは「手続補正書（法第11条の規定による補正）」とし、令第1条第2項の規定による命令に基づく補正をするときは「手続補正書（令第1条第2項の規定による命令に基づく補正）」とし、第27条の3第1項の規定による補正をするときは「手続補正書（第27条の3第1項の規定による補正）」とし、第28条第1項の規定による命令に基づく補正をするときは「手続補正書（第28条第1項の規定による命令に基づく補正）」とし、第50条の3第3項の規定によるフレキシブルディスクの提出するときは、「第50条の3第5項の規定による命令に基づくフレキシブルディスクの提出」とし、第50条の3第5項の規定による命令に基づくフレキシブルディスクの提出するときは、「第50条の3第5項の規定による命令に基づくフレキシブルディスクの提出」とし、第50条の3第5項の規定による命令に基づく配列表を記載した書面の提出するときは、「第50条の3第5項の規定による命令に基づく配列表を記載した書面の提出」とし、第50条の3第8項の規定による命令に基づく補正をするときは、「手続補正書（第50条の3第8項の規定による命令に基づく補正）」とする。
- 提出先は、特許庁審査官が答弁書の提出又は補正の機会を付した場合には当該特許庁審査官、その他の場合には特許庁長官とする。
- 「補正の対象」の欄には、「願書のⅡ、出願人の欄」のように補正をする書類名と補正する箇所を記載する。
- 「補正の内容」の欄には、「別紙のとおり」と記載するとともに補正事項を指摘し、補正のための送替用紙を別紙として添付する。ただし、補正の結果、用紙の全体が削除されることとなる場合、法第6条、令第1条第2項、第28条第1項若しくは第50条の3第8項の規定による命令に基づく手続の補正の場合又は第27条の3第1項の規定による手続の補正の場合であって、その補正に係る事項についての記載原本の書き換えが容易にできるときは送替用紙を用いることを受けない。なお、法第11条の規定による補正のための送替用紙を添付する場合において、その補正に係る事項が、一部の箇所の削除又は修正若しくは追加である場合には、用紙の明りょうさ及び直接複製に影響を及ぼさないことを条件として、先に提出した補正書の写しに補正をすることにより、送替用紙とすることができる。

- 請求の範囲について補正をするときは、当該補正に係る請求の範囲を次のように記載した送替用紙を添付する。
- 新たに請求の範囲を追加するときは、その追加する請求の範囲に補正前の請求の範囲の最後のものに付した番号を「○（追加）」のように記載する。
- いずれかの請求の範囲を削除するときは、その削除する請求の範囲に付されている番号を「○（削除）」のように記載する。
- 請求の範囲の数を増減せずに補正するときは、その補正された請求の範囲に補正前の請求の範囲の番号と同一の番号を「○（補正）」のように記載する。
- 第50条の3第3項の規定によりフレキシブルディスクを提出するときは第50条の3第5項の規定による命令に基づきフレキシブルディスクを提出するときは、次の表で記載する。
- 「7 添付書類の目録」の欄に次のように記載する。

平成 年 月 日
特許庁長官 殿
本書に添付したフレキシブルディスクに記載した発明配列又はアミノ酸配列は、明細書に記載した発明配列又はアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを保証します。

- 国際出願の表示
発明の名称
特許出願人・代理人
（印）
ハ 「フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面」は、原則として、「出願人氏名（名称）」、「代理人氏名（名称）」、「国際出願の表示」、「発明の名称」、「使用した文字コード」、「配列を記録したファイル名」及び「連絡先（電話番号及び担当者の氏名）」の項目を設けて記載することにより作成する。
- ニ 「5 補正の対象」及び「6 補正の内容」の欄は設けない。
- 7 第50条の3第5項の規定による命令に基づき配列表を記載した書面を提出するときは、「7 添付書類の目録」の欄に次のように記載し、「5 補正の対象」及び「6 補正の内容」の欄は設けない。
- 5 添付書類の目録 1 配列表を記載した書面 1通
- 8 用紙は、日本工業規格A4（横21cm、縦29.7cm）の大きさとし、可燃性のある、丈夫な、白色の、滑らかな、光沢のない、耐久性のあるものを縦長にして、折らずに片面のみを用い、用紙には、不要な文字、記号、枠線、けい線等を記載してはならない。
- 9 用紙は、しわ及び折り目があってはならない。
- 10 余白は、少なくとも用紙の上端、右端及び下端におおの2cm並びに左端に2.5cmをとるものとし、原則としてその上端及び左端についてはおのおの4cm並びにその右端及び下端についてはおのおの3cmを越えないものとする。この場合において、余白は、完全な空白としておくこととする。ただし、上端の余白の左端であって上端から1.5cm以内に番付番号（願書に記載されている場合に限り。）を付すことができる。
- 11 手続補正書は、タイプ印字又は印刷によるものとし、写真、静電的方法、写真オフセット及びマイクロフィルムによって直接に任意の部数複製をすることができるとして作成する。
- 12 手続補正書のすべての用紙には、アラビア数字により1から始まる連続番号を用紙（余白部分を除く。）の上端又は下端の中央に付す。
- 13 タイプ印字による場合において、行の間隔は、少なくとも5mm以上をとる。ただし、備考16、19においてローマ字を用いるときは、1.5文字の幅をとる。
- 14 記載事項は、4号活字の大きさの文字（備考16、19においてローマ字を用いるときは、大文字の大きさが縦0.21cm以上の文字）により、かつ、暗色の退色性のない色であって備考9に定める要件を満たすもので記載する。
- 15 「国際出願の表示」の欄には、既に特許庁から国際出願番号の通知を受けている場合には、その番号を「PCT/P/○○/○○○○」のように記載し、国際出願番号の通知を受ける前の場合には、その国際出願の提出日を月年日の順に「○○.○○.○○」の国際出願（年）については西暦紀元の下2桁）のように記載するとともに、番付番号（願書に記載されている場合に限り。）を合わせて記載する。
- 16 「氏名（名称）」は、自然人にあっては姓及び名を姓、名の順に記載し、また、法人にあってはその名称を記載する。
- 17 「あて名」は、「日本国、何県、何郡、何村、大字何、字何、何番地、何号」のように詳しく記載するとともに、郵便番号を記載する。
- 18 氏名若しくは名称又はあて名には、これらの音訳又は英語への訳訳をローマ字を用いて併記する。
- 19 「国籍」は、出願人又は代表者がその国民である国の国名を記載する。
- 20 「住所」は、出願人又は代表者がその居住者である国の国名を記載する。
- 21 国名を記載する場合においては、特許庁長官が指定する国の名称を日本語及び英語により表示する。
- 22 「代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」、「弁理士」又は「法定代理人」のうち該当するものを記載する。
- 23 代理人によるときは本人の印は不要とし、代理人によらないときは「代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 24 各用紙においては、原則として捺印、訂正、重ね書き及び行間挿入を行うてはならない。
- 25 手続補正書の用紙は、容易に分離し、又はとじ直すことができるように例えばクリップ等を用いてとじる。
- 26 「あて名」は出願人、代表者、代理人又は復代理人各人ごとに1つのあて名のみを記載する。
- 27 「復代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」又は「弁理士」のうち該当するものを記載する。
- 28 復代理人によるときは代理人の印は不要とし、復代理人によらないときは「復代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 29 日付は、西暦紀元及びグレゴリー暦により、日についての数字、月についての数字及び年についての最後から2つの数字をこの順序に従ってそれぞれについて2桁のアラビア数字で表示し、かつ、日及び月の数字の後にピリオドを付す（例えば1978年3月30日は「30.03.78」）。他の紀元又は暦を用いる場合には、西暦紀元及びグレゴリー暦による日付を併記する。

様式第15（第31条関係）

| 手 続 補 正 書 | |
|------------|---------------------------|
| 特許庁長官 | 殿 |
| 特許庁審査官 | 殿 |
| 1 国際出願の表示 | |
| 2 出願人（代表者） | 氏名（名称） あて名 国籍 住所 |
| 3 代理人 | 氏名 あて名 |
| 4 補正命令の日付 | |
| 5 補正の対象 | |
| 6 補正の内容 | |
| 7 添付書類の目録 | |

THIS PAGE BLANK (USPTO)